



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO VEGF EM GATAS COM TUMORES
MAMÁRIOS

MARTA BURGUETE PEREIRA RODRIGUES TAVARES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte
Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa
Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria João da Costa Soares

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO VEGF EM GATAS COM TUMORES
MAMÁRIOS

MARTA BURGUETE PEREIRA RODRIGUES TAVARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Mário António Pereira da Silva

Soares de Pinho

Doutor Fernando António da Costa

Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa

Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria João da Costa Soares

2016

LISBOA

Dedicatória

À minha avó, que estará sempre no meu pensamento, no meu coração, e certamente, sempre a meu lado.

À minha mãe, por estar sempre ao meu lado, a fazer o possível e o impossível para que eu tivesse tudo o que precisava.

Ao meu pai. Que este seja o primeiro de muitos orgulhos,

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, porque para além de me ter aberto portas quando tudo parecia perdido, ainda teve a paciência, amabilidade e compaixão de me acompanhar nesta etapa, que coincidiu com muitas outras menos boas.

À Dra. Maria João Soares por toda a simpatia, boa disposição e ajuda prestada, que foi muita, durante todo o estágio. A tua energia motivou-me a descobrir novas áreas de interesse para a minha vida profissional.

À Dra. Margarida Simões por todo o carinho e ajuda, sempre prestável e atenciosa.

A todo o pessoal do CIISA e da Anatomia Patológica, por sempre tentarem ajudar e esclarecer todas as dúvidas.

À minha Marta. Obrigada por toda a tua ajuda e amizade. Penso que esta ligação não se limitou ao estágio e, quem sabe, não será para a vida.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, por sempre acreditarem em mim.

RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS NÍVEIS SÉRICOS DO VEGF EM GATAS COM TUMORES MAMÁRIOS

Resumo

A importância da angiogênese no crescimento e desenvolvimento tumoral é de grande relevância. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um potente fator angiogénico que desempenha funções em diversos processos fisiológicos e patogénicos.

Uma vez que os tumores mamários felinos são a terceira neoplasia mais frequente nesta espécie, torna-se relevante o estudo de novos biomarcadores de forma a fazer uma deteção precoce e expedita desta doença, bem como investigar novas formas de terapia coadjuvantes à cirurgia.

Os objetivos deste estudo incluíam a comparação dos níveis de VEGF sérico (sVEGF) entre gatas saudáveis e gatas com tumores mamários, e avaliar se estes níveis, em gatas doentes, se relacionam com algum parâmetro histopatológico do tumor.

O estudo avaliou 14 gatas saudáveis e 44 gatas com tumores mamários, sendo a deteção de sVEGF realizada pela técnica de *dot blot*.

Os níveis de VEGF variaram extensivamente nos dois grupos. Apesar de terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de sVEGF no grupo de gatas saudáveis e de gatas doentes, não foram encontradas correlações entre os níveis de sVEGF e os diversos parâmetros histopatológicos estudados.

Desta forma, concluiu-se que os níveis de sVEGF estão aumentados na presença de tumor mamário, tornando o VEGF um bom indicador de doença.

Palavras-chave: carcinoma mamário felino; VEGF; sVEGF; *Dot Blot*; Gata

CLINICAL RELEVANCE OF SERUM VEGF IN FELINE MAMMARY TUMOURS

Abstract

The importance of angiogenesis in tumor growth and development is of great significance. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic factor that plays roles in various physiological and pathological processes.

Since feline mammary tumours are the third most common cancer in this species, it is relevant to study new biomarkers in order to make an early and quick detection of this disease, as well as investigate new ways of supporting therapy.

The objectives of this study were to compare serum VEGF levels (sVEGF) between healthy cats and cats with mammary tumours, and to verify if the sVEGF levels of diseased cats correlate with any of the histopathological parameters evaluated.

The study included 14 healthy cats and 44 cats diagnosed with mammary tumours, with sVEGF detection carried out by dot blot technique.

VEGF levels varied extensively within the two groups. Significant differences were found between the healthy cats group and the group of cats with mammary tumours. No correlations were found between sVEGF levels and the several histopathological parameters evaluated.

In sum, it was concluded that sVEGF levels are increased in cats with mammary tumours, making VEGF a good indicator of disease.

Key words: Mammary feline carcinoma; VEGF; sVEGF; Dot Blot; cat

Índice geral

Dedicatória	i
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice geral	ix
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	x
Índice de gráficos	x
Lista de abreviaturas	x
Descrição do estágio	1
Introdução	2
Revisão bibliográfica	3
1 Glândula mamária	3
1.1 Anatomia	3
1.2 Tumores mamários felinos	4
1.2.1 Epidemiologia	4
1.2.2 Apresentação clínica	5
1.2.3 Fatores de risco	5
1.2.4 Características macroscópicas	6
1.2.5 Características microscópicas	7
1.2.6 Prognóstico	10
1.2.7 Terapêutica	11
2 VEGF	12
2.1 Família VEGF	13
2.2 Recetores	14
2.2.1 VEGFR-1	15
2.2.2 VEGFR-2	15
2.2.3 VEGFR-3	15
2.2.4 Outros recetores	16
2.3 Funções da VEGF em condições fisiológicas	17
2.3.1 Desenvolvimento embrionário e pós-natal	17
2.3.2 Crescimento do esqueleto e formação óssea endocondral	17
2.3.3 Angiogénese ovárica	18
2.4 Funções da VEGF em condições patológicas	18
2.4.1 Síndromes neovasculares intraoculares	18
2.4.2 Inflamação e edema cerebral	18
2.4.3 Patologias do trato reprodutivo feminino	18
2.5 VEGF tumoral	18
2.6 VEGF em tumores mamários	22
2.6.1 Tecido	22
2.6.2 Sangue	23
2.7 Terapêutica anti-VEGF	25
2.8 VEGF nos TMFs	27
Trabalho experimental	28
1 Introdução	28
2 Objetivos	28
3 Material e métodos	28
3.1 Amostra	28
3.2 Reagentes	29
3.3 Técnica de Dot Blot	29
3.4 Análise das imagens obtidas em película	30
3.5 Análise estatística	30
4 Resultados	31
4.1 Caracterização da amostra	31
4.2 Deteção do VEGF	32

4.3	Exclusão de soros hemolisados	34
4.4	Comparação de doentes e saudáveis quanto à densidade de píxeis	34
4.5	Associação entre a concentração de sVEGF e características histopatológicas	35
	Discussão	37
	Conclusão	39
	Bibliografia	40
	Anexos	45
	Anexo 1: Caracterização detalhada dos tumores	45
	Anexo 2: Resultados obtidos	47
	Anexo 3: Resultados dos testes t.....	49

Índice de figuras

Figura 1.	Esquema representativo das glândulas mamárias num carnívoro doméstico.	4
Figura 2.	Representação esquemática da família VEGF e seus recetores.....	13
Figura 3.	Fatores de crescimento e recetores da família VEGF	14
Figura 4.	Papel dos recetores do VEGF em diferentes linhas celulares	16
Figura 5.	Função do VEGF em tumores.....	19
Figura 6.	Papel da hipóxia nos níveis de expressão do VEGF	20
Figura 7.	Interações dos recetores que promovem a sinalização do VEGF em células tumorais e o papel principal das NRPs.....	21
Figura 8.	Ensaio final da membrana M1. Película com um tempo de exposição de 4 min. ..	33
Figura 9.	Ensaio final da membrana M2. Película com um tempo de exposição de 5 min. ..	33
Figura 10.	Ensaio final da membrana M3. Película com um tempo de exposição de 5 min. ..	33

Índice de tabelas

Tabela 1.	Classificação TNM	6
Tabela 2.	Classificação histológica de tumores mamários da espécie felina.....	7
Tabela 3.	Fatores de prognóstico e indicadores para quimioterapia adjuvante em TMF malignos	12
Tabela 4.	Expressão de VEGFs e recetores em tumores humanos.	21
Tabela 5.	Fármacos anti-VEGF disponíveis ou em desenvolvimento	26
Tabela 6.	Distribuição das idades dos animais avaliados.	31
Tabela 7.	Características clínicopatológicas dos TMFs.....	32
Tabela 8.	Comparação de resultados entre animais saudáveis e animais doentes.....	34
Tabela 9.	Resultados da comparação dos valores de sVEGF com os diferentes parâmetros histopatológicos.	36
Tabela 10.	Descrição dos tumores mamários das gatas doentes.	45
Tabela 11.	Valores obtidos na quantificação da intensidade de píxeis nas gatas saudáveis, por membrana.	47
Tabela 12.	Valores obtidos na quantificação da intensidade dos píxeis em gatas com TM, por membrana.	48
Tabela 13.	Resultados dos testes t relativos a cada membrana, incluindo média, desvio padrão e valor de <i>P</i>	49

Índice de gráficos

Gráfico 1.	Caixa de bigodes relativa aos resultados da membrana 1.....	34
Gráfico 2.	Caixa de bigodes relativa aos resultados da membrana 2.....	35
Gráfico 3.	Caixa de bigodes relativa aos resultados da membrana 3.....	35

Lista de abreviaturas

A1 - Glândula mamária abdominal cranial
A2 - Glândula mamária abdominal cranial

Ac - Anticorpo
 ADN – Ácido desoxirribonucleico
 Ag - Antigénio
 AgNORs – Regiões Organizadoras Nucleolares Arginofílicas
 ARN – Ácido ribonucleico
 Arnt - *Aromatic hydrocarbon nuclear translocator*
 BSA – *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)
 cm - centímetro
 cm³ – centímetros cúbicos
 COX-2 – Cicloxigenase 2
 ECL - *Enhanced Chemiluminescence*
 EGFR – *Epidermal growth factor receptor* (recetor de fator de crescimento epidérmico)
 EG-VEGF – *Endocrine gland VEGF* (VEGF de glândula endócrina)
 ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima)
 EMT – *Epithelial to mesenchymal transition* (transição de epitelial para mesenquimatoso)
 Et al. – *et alia* (e outros)
 FAS - Fosfatase alcalina
 FeLV – *Feline leukemia virus* (Vírus da leucemia felina)
 FMV – UL – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
 HER – *Human epidermal growth factor receptor* (recetor de fator de crescimento epidérmico humano)
 HER-2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (receptor do factor de crescimento epidérmico humano tipo-2)
 HIF-1 – *Hypoxia inducible factor* (factor indutor de hipóxia)
 HRP – *Horseradish peroxidase* (peroxidase de rábano)
 IF - Imunofluorescência
 IHQ – Imunohistoquímica
 kDa - Kilodalton
 mARN - Ácido ribonucleico mensageiro
 ME – Matriz extracelular
 mg - miligrama
 ml – mililitro
 MMP-9 - (Matriz metaloproteinase 9)
 MVD – *microvessel density* (densidade microvascular)
 N – Número de casos
 NA – Não analisado
 NO – *Nitric oxide* (óxido nítrico)
 NRP – *Neuropilin* (Neuropilino)
 OVH – Ovariectomia
 PAAF – Punção aspirativa por agulha fina
 PCR – *Polymerase in chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)
 PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (antigénio nuclear de células em proliferação)
 P. ex. – Por exemplo
 PGE2 – Prostaglandina E
 PLGF - *Placental growth factor* (fator de crescimento placentário)
 RE – Recetores de estrogénio
 RP – Recetores de progesterona
 RTK – *Receptor tyrosine kinase* (recetor tirosina cinase)
 T1 – Glândula mamária torácica cranial
 T2 – Glândula mamária torácica caudal
 TBS – *Tris buffered saline* (tampão tris salino)
 TLD – Tempo livre de doença
 TM – Tumor mamário
 TMF – Tumor mamário felino
 TNM – Tumor-Nodo-Metástase
 TS – Tempo de sobrevivência
 VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial)

pVEGF – VEGF plasmático

sVEGF – VEGF sérico

VEGFR - *Vascular endothelial growth factor receptor* (recetor do fator de crescimento endotelial)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

μL – microlitro

°C – Graus centígrados

% – Percentagem

> – Maior

< – Menor

≥ – Maior ou igual

≤ – Menor ou igual

= - Igual

® – Marca registada

DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO

O estágio curricular que permitiu o desenvolvimento deste trabalho decorreu no laboratório do CIISA (Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal), na FMV-UL (Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa), entre novembro de 2014 e março de 2015. Na área da Investigação em Oncologia Veterinária, este estudo teve como objetivo identificar e determinar a relevância clínica dos níveis séricos de VEGF em gatas com tumores mamários.

A técnica de *Dot Blot* foi utilizada para alcançar os objetivos propostos, tendo para tal sido necessário algum tempo para a otimização desta metodologia.

Foi possível observar e participar na execução de outras técnicas de laboratório, como o *Western Blot* e a Imunohistoquímica, e ainda contactar com outras técnicas laboratoriais utilizadas noutros laboratórios de Investigação Veterinária nas áreas da Parasitologia e da cultura de células.

INTRODUÇÃO

O gato doméstico, *Felis catus* (Linnaeus, 1758), tal como todos os mamíferos, apresenta glândulas mamárias, que permitem à fêmea produzir leite por algum tempo após nascimento das suas crias, de modo a provir nutrientes aos recém nascidos. Para além disso, o colostro produzido pelas glândulas após o nascimento tem também uma função importante na passagem de imunidade passiva (Kay, 1998).

Nesta espécie, os tumores mamários (TM) são o terceiro tipo de tumor mais frequente, sendo por isso de extrema importância o seu estudo (Misdorp, 2002).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011) há seis marcos essenciais em processos tumorais, e nestes marcos está incluída a angiogénese. Tal como as células normais, o tumor requiere nutrientes e oxigénio. Esta angiogénese é sinalizada por proteínas que se ligam a recetores presentes nas células endoteliais vasculares. Um dos fatores mais importantes na angiogénese tumoral é o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e neste estudo será abordado com maior detalhe a sua função nos carcinomas mamários felinos.

1 Glândula mamária

1.1 Anatomia

As gatas possuem quatro pares de glândulas dispostas antero-posteriormente na região ventral torácica e abdominal a 3 cm da linha mediana (Dyce, Sack & Wensing, 2010). Segundo Peleteiro (1994) estas glândulas incluem um par torácico, um par abdominal cranial, um par abdominal caudal e um par inguinal, mas segundo Costa (2010), estas glândulas podem ainda ter a denominação de T1, T2, A1 e A2, sendo as T torácicas e as A abdominais.

A mama não lactante tem cerca de 1 cm de comprimento com quatro a oito aberturas e aumenta cerca de dez vezes durante a lactação (Dyce et al., 2010).

A glândula mamária é caracterizada histologicamente como sendo uma glândula sudorípara modificada, túbulo-alveolar composta e esta surge apenas em animais da classe *mammalia* (König & Liebich, 2004).

As glândulas são formadas por dois tipos de tecido: o parênquima e o estroma. O parênquima contém as unidades funcionais encarregues da secreção láctea. O estroma possui a parte de sustentação, sendo formado pelo tecido conjuntivo intersticial. Cada glândula é formada por lóbulos separados por septos conjuntivos e cujos ductos drenam para canais excretores mais calibrosos, denominados de ductos lactíferos (Peleteiro, 1994).

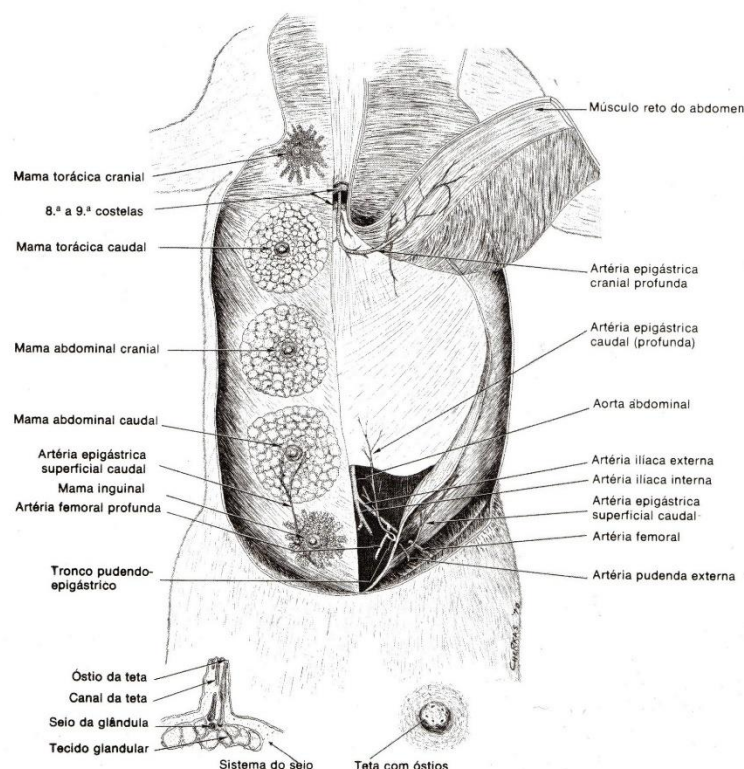
O lóbulo consiste em vários ductos intralobulares que se unem formando o ductos interlobular terminal. Os ductos interlobulares unem-se para formar um ducto interlobular terminal, que por sua vez, se unem para formar os ductos lactíferos. Os ductos lactíferos e os ductos interlobulares terminais são revestidos por um epitélio cubóide simples, envolvido por células mioepiteliais (Junqueira & Carneiro, 2004).

Tal como ilustrado na Figura 1, o suprimento sanguíneo destas glândulas tem origem nas artérias pudendas externas e nas torácicas interna e lateral. Os pares craniais são irrigados pela artéria torácica lateral e mais profundamente pela artéria epigástrica cranial superficial e pelos ramos das artérias intercostais (torácica interna). Os pares caudais são irrigados pela artéria epigástrica caudal superficial (artéria pudenda externa) e, profundamente, pelos ramos da artéria abdominal cranial e das artérias ilíacas circunflexas profundas (Dyce et al., 2010).

Ao nível da circulação linfática, a linfa das glândulas mamárias torácicas é drenada nos linfonodos axilar, axilar acessório e esternal e, em seguida, dirige-se aos linfonodos epigástricos caudais. A rede linfática das glândulas abdominais posteriores e inguinais é também ela anastomosada e drenada para os linfonodos inguinais (Dyce et al., 2010).

Desta forma a circulação linfática faz-se de forma independente entre as glândulas anteriores e as posteriores, sendo que os vasos linfáticos das glândulas homolaterais apresentam anastomoses.

Figura 1. Esquema representativo das glândulas mamárias num carnívoro doméstico.



No caso da gata é possível observarem-se 4 pares de glândulas (extraído de Getty, Grossman & Sisson, 2006).

1.2 Tumores mamários felinos

1.2.1 Epidemiologia

Nas gatas o tumor mamário é o terceiro tipo de tumor mais comum, sendo mais frequente nos animais com 10 a 12 anos (Misdorp, 2002; Sorenmo, Worley & Goldschmidt, 2013; Zappulli et al., 2015).

Todas as raças são afetadas, mas a siamesa parece ter maior risco comparativamente às outras (Morris & Dobson, 2001).

Os tumores mamários felinos (TMFs) ocorrem quase exclusivamente em fêmeas apesar de um estudo realizado por Skorupski et al. (2005) concluir que os carcinomas mamários felinos comportam-se de forma semelhante em ambos os sexos. Apesar da amostra ser pequena, os autores mostraram que, à semelhança das fêmeas, o tamanho parece ser também um fator de prognóstico nos machos.

Os TMFs constituem aproximadamente 17% de todas as neoplasias felinas na gata. A maioria são carcinomas hormono-independentes de tipo simples (80-90%). Destes, 50 a 90% metastizam e estas metástases incluem o linfonodo regional (83%), pulmões (83%), fígado (25%) e pleura (22%) (Zappulli et al., 2015).

1.2.2 Apresentação clínica

Por norma, os tumores são facilmente detetáveis durante o exame clínico e aparecem como massas firmes discretas na glândula mamária. É comum serem detetadas várias massas mamárias aquando do diagnóstico. Massas maiores podem aparecer ulceradas, inflamadas e infetadas. Os linfonodos regionais podem ou não aparecer aumentados (Peleteiro, 1994).

1.2.3 Fatores de risco

1.2.3.1 Associação hormonal

A exposição a hormonas ováricas está implicada na tumorigénese mamária. Um estudo indicou uma redução de 91% e de 86% no risco de desenvolvimento de TMFs em gatas esterilizadas antes dos seis meses e antes de um ano de idade, respetivamente (Zappulli et al., 2015).

Além do risco aumentado por exposição a hormonas ováricas endógenas, gatas tratadas regularmente com progestagénios têm um risco de 3,4 vezes maior de desenvolverem carcinomas mamários, comparativamente às que não recebem esse tratamento (Misdorp, 2002, Sorenmo et al., 2013).

Lesões benignas nas gatas, particularmente alterações fibroadenomatosas (hipertrofia mamária) estão associadas a progestagénios endógenos, durante a gestação, ou exógenos. Skorupski et al. (2005) demonstraram que mais de um terço dos gatos machos estudados tinham história de terapia com progestagénios, pelo que foi sugerido que possam promover o desenvolvimento de carcinomas mamários em gatos de sexo masculino.

1.2.3.2 Idade

A idade foi considerada por alguns estudos como fator de prognóstico uma vez que gatas mais velhas sobrevivem menos tempo (Sorenmo et al., 2013), mas estes dados não são consistentes entre autores (Zappulli et al., 2015).

1.2.3.3 Alimentação

Misdorp (2002) refere que alguns estudos epidemiológicos em humanos, bem como estudos com experimentação animal sugerem que a obesidade e uma alimentação com elevados teores de gordura aumentam o risco de cancro mamário.

1.2.3.4 Vírus

Alguns investigadores mostraram a presença de partículas virais em carcinomas mamários felinos. Mais especificamente, antigénios dos vírus da leucemia felina (FeLV) e do retrovírus RD-114 foram identificados em carcinomas, mas não em tumores benignos ou tecido mamário normal (Misdorp, 2002).

1.2.3.5 Raça

Vários autores apontam que a raça siamesa apresenta um maior risco de desenvolver TMFs, sendo estes diagnosticados numa idade mais precoce (9 anos) relativamente a outras raças (Misdorp, 2002; Zappulli et al., 2015).

Um estudo indicou que as gatas de pêlo curto apresentam maior incidência no desenvolvimento de carcinomas invasivos (Zappulli et al., 2015).

1.2.4 Características macroscópicas

Apesar de todas as glândulas mamárias poderem desenvolver TMs, as glândulas torácicas são as mais afetadas, podendo atingir toda a cadeia mamária (Peleteiro, 1994). Como já referido, ao exame clínico podem ser detetadas uma ou várias e estas podem aparecer ulceradas, inflamadas e infetadas.

1.2.4.1 Estadiamento

O estadiamento do processo tumoral é feito com base no sistema TNM (Tumor-Nodo-Metástase) e é um fator imprescindível para determinar o prognóstico do animal (Coelho, 2013). Tal como está resumido na Tabela 1, o estadiamento tem por base a determinação do tamanho do tumor primário (T), existência de metástases nos linfonodos regionais (N) e presença de metástases distantes (M) (Lana et al., 2007).

Os estadios variam de I a IV consoante as suas características: I para tumores T1, N0 e M0, II para tumores T2, N0 e M0, III para T3, N0, M0 ou qualquer T (1, 2 ou 3), N1 e M0 e IV para tumores com qualquer T (1, 2 ou 3), qualquer N (N0 ou N1) e M1 (Lana et al., 2007).

Na classificação apresentada por Morris e Dobson (2001) é ainda feita a

Tabela 1. Classificação TNM (extraído de Morris & Dobson (2001)).

T Primary tumour (evaluate multiple tumours independently)	
T0	No evidence of tumour
T1	Tumour <3 cm maximum diameter
T1a	Not fixed
T1b	Fixed to skin
T1c	Fixed to muscle
T2	Tumour 3–5 cm maximum diameter
T2a	Not fixed
T2b	Fixed to skin
T2c	Fixed to muscle
T3	Tumour >5 cm maximum diameter
T3a	Not fixed
T3b	Fixed to skin
T3c	Fixed to muscle
T4	Tumour any size, inflammatory carcinoma
N Regional lymph nodes (RLN) (axillary or inguinal; clinical or histological evaluation)	
N0	No evidence of involvement
N1	Ipsilateral involvement
N1a	Not fixed
N1b	Fixed
N2	Bilateral involvement
N2a	Not fixed
N2b	Fixed
M Distant metastasis (clinical, radiographic or histological evaluation)	
M0	No evidence of metastasis
M1	Distant metastasis including distant lymph nodes

distinção entre tumor aderente à pele ou ao músculo e entre envolvimento de linfonodos ipsilaterais ou bilaterais.

1.2.5 Características microscópicas

1.2.5.1 Classificação histológica

A classificação histológica pode ser feita relativamente ao tipo histológico e ao grau de malignidade histológica (Matos et al., 2012).

Em termos citológicos, a lesão pode ser avaliada por PAAF (Punção aspirativa por agulha fina), que apresenta um alto grau de precisão (72-99%) no diagnóstico de malignidade e sub-tipagem (Shafiee et al., 2013).

A avaliação histológica do tumor pode ser realizada por biópsia ou por avaliação de secções tumorais após mastectomia. Geralmente é feita a excisão do tumor e posterior avaliação da massa. Apenas se recorre à biópsia quando há contraindicações à cirurgia (Peleteiro, 1994). Em relação ao tipo histológico os tumores são classificados de acordo com a classificação feita por Misdorp et al. (1999) para a WHO (*World Health Organization*), resumida na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação histológica de tumores mamários da espécie felina (adaptado de Misdorp et al. 1999).

Hiperplasias/Displasias	Hiperplasia ductal	
	Hiperplasia lobular	Hiperplasia epitelial
		Adenose
		Alteração fibroadenomatosa
	Quistos	
	Ectasia ductal	
	Fibrose focal (Fibroesclerose)	
Tumores benignos	Adenoma	Simplex
		Complexo
	Fibroadenoma	De alta celularidade
		De baixa celularidade
	Tumor benigno Misto	
	Papiloma ductal	
Tumores malignos	Carcinoma não infiltrativo in situ	
	Carcinoma túbulo-papilífero	
	Carcinoma sólido	
	Carcinoma cribiforme	
	Carcinoma mucinoso	
	Carcinosarcoma	
	Carcinomas ou sarcomas em tumores benignos	

Carcinomas

- Carcinoma não infiltrativo *in situ*

Estas lesões são frequentemente multicêntricas e não são visíveis a olho nu. Podem fazer parte de uma doença fibrocística ou podem ser encontradas acidentalmente perto de carcinomas infiltrativos ou outros tumores mamários. Carcinomas não infiltrativos de tipo simples (um tipo celular) são frequentemente encontrados no cão e no gato. Carcinomas não infiltrativos complexos não foram reportados (Misdorp, 2002).

A diferença entre carcinoma *in situ* e hiperplasia típica ou atípica pode ser difícil de identificar.

- Carcinoma simples

Estes tumores são os mais frequentes em cães e gatos. Tumores deste tipo só têm uma forma celular. Estes tumores tem uma tendência forte para infiltrar tecidos vizinhos ou vasos. A infiltração linfática e sanguínea são frequentes. Na gata, o tempo de sobrevivência médio é de 10 a 12 meses (Misdorp, 2002).

Baseado na sua diferenciação, podem ser classificados como túbulo-papilíferos, cribiformes ou sólidos (Misdorp, 2002).

Os carcinomas túbulo-papilíferos são caracterizados pela formação de túbulos com ou sem projeções papilares. No gato deve ser diferenciado do tipo cribiforme.

O carcinoma cribiforme é frequente na gata. É muito invasivo e as células epiteliais neoplásicas estão dispostas formando crivos, com lúmens pequenos e arredondados (Misdorp, 2002).

O carcinoma sólido é frequente no gato e as células aparecem como cordões ou ninhos. A quantidade de estroma varia de pouco a moderada.

- Carcinoma mucinoso

Este carcinoma é raro na gata. É caracterizado por grande presença de muco (Misdorp, 2002).

Em relação ao grau de malignidade, este é classificado segundo três parâmetros: formação tubular, pleomorfismo nuclear e frequência mitótica (Hayes & Mooney, 1985; Castagnaro et al., 1998). Estes parâmetros são avaliados da seguinte forma:

- Formação tubular: é determinada por avaliar todas as partes de duas secções tumorais e observar a porção com estruturas tubulares:
 - Um ponto: Quando mais de 75% da área tumoral exhibe estruturas tubulares;
 - Dois pontos: 10-75% de formações tubulares;
 - Três pontos: <10% de formações tubulares.
- O pleomorfismo nuclear é determinado quantitativamente e qualitativamente:
 - Um ponto: Quando os núcleos são pequenos, com margens regulares e cromatina uniforme.

- Dois pontos: Quando as células aparecem mais largas do que o normal, com vesículas nucleares, nucléolos claramente visíveis e moderada variabilidade em tamanho e forma dos núcleos e citoplasmas.
- Três pontos: Quando as células variam estritamente em tamanho e forma e apresentam núcleos grandes ou bizarros com múltiplos nucléolos proeminentes.
- . A frequência mitótica é determinada à periferia do tumor, onde a diferenciação celular é frequentemente mais elevada. São vistos pelo menos 10 campos por tumor com ampliação de 100x, e são apenas contabilizadas células em anáfase, telófase e metáfase:
 - Um ponto: Quando estão presentes perto de 7 mitoses por campo;
 - Dois pontos: 8 a 15 mitoses por campo;
 - Três pontos: Mais de 15 mitoses por campo.

Depois de feita a soma dos pontos de cada categoria, o grau de malignidade é obtido:

Grau I: 3-5 pontos corresponde a um carcinoma bem diferenciado;

Grau II: 6-7 pontos corresponde a um carcinoma moderadamente diferenciado;

Grau III: 8-9 pontos para carcinoma pouco diferenciado.

1.2.5.2 Marcadores imunohistoquímicos

1.2.5.2.1 Recetores de estrogénio (RE) e Recetores de progesterona (RP)

O tecido normal mamário e os tumores benignos são maioritariamente RE e RP positivos (Misdorp, 2002). Apesar da sobre-expressão dos recetores de progesterona e dos recetores de estrogénio ser frequente nas fases tumorais iniciais, vários estudos apontam para que os carcinomas mamários felinos sejam RE e RP negativos (Sorenmo et al., 2013).

No estudo realizado por Millanta et al. (2005) foi demonstrado que a expressão de RE é maior em tecidos saudáveis do que em carcinomas e que a redução de expressão deste recetor é mais assinalável em carcinomas felinos, concluindo-se que os tumores RE negativos apresentam pior prognóstico. Concluiu-se ainda que a expressão de RP aumenta em lesões displásicas e em carcinomas *in situ* e diminui em carcinomas invasivos.

1.2.5.2.1 Ki-67

A Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases de ciclo celular exceto em G0, sendo por isso um marcador de proliferação celular (Esteve & Hortobagyi, 2004).

Soares et al. (2015) concluíram que as gatas com tumores mamários com um índice Ki-67 abaixo do *cut off* de 14% mostraram um prognóstico mais favorável do que gatas com níveis superiores.

Nos estudo realizado por Seixas et al. (2011) este índice de proliferação foi avaliado por imunohistoquímica (IHQ) com um anticorpo (Ac) monoclonal e as células foram consideradas positivas quando o núcleo apresentava marcação forte ou média que fosse difusa ou nuclear.

O índice Ki-67 foi determinado à periferia do tumor nas áreas mais ativamente mitóticas ou que apresentassem alta positividade para o anticorpo usado, excluindo células não tumorais. Desta forma, Seixas et al. (2011) concluíram que graus mais elevados de malignidade estão associados a índices de proliferação mais elevados.

1.2.5.2.2 PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

É uma proteína facilitadora da atividade processiva da maquinaria de replicação. A sua expressão é máxima durante a fase G1/S do ciclo celular, e apresenta-se aumentada nos tumores malignos comparativamente aos tumores benignos, não estando relacionada com o grau de pleomorfismo nuclear (Hughes & Dobson, 2012).

1.2.5.2.3 AgNOR (*Argyrophilic Nucleolar Organizer Region*)

AgNORs são componentes nucleolares funcionais e estruturais associados a proteínas argirofílicas envolvidas na transcrição e no processamento do ARN ribossomal. O seu tamanho e número estão associados à proliferação celular (Hughes & Dobson, 2012).

Em TMFs, um estudo associou um índice menor que 5,9 AgNORs por célula a um maior tempo de sobrevida (TS) (Zappulli et al., 2015).

1.2.5.2.4 HER-2 (c-erbB-2)

É o recetor do fator de crescimento epidérmico que tem uma atividade tirosina cinase e que tem funções na regulação do ciclo celular e na diferenciação. Na mulher com tumores mamários, a sua sobre-expressão está associada a mau prognóstico, mas associada a uma resposta favorável a alguns agentes de quimioterapia (Hughes & Dobson, 2012).

Alguns autores demonstraram existir uma correlação entre a expressão do HER-2 e o TS (Millanta et al., 2005) e outros não encontraram qualquer diferença entre diversas variáveis clinicopatológicas e a sobre-expressão do HER-2 em tumores mamários felinos (Soares et al., 2012).

1.2.5.2.5 p53

Esta proteína é responsável pela supressão tumoral e foi sugerido que mutações na sua sequência podem levar à invasão tumoral. Na mulher, mutações conferem pior prognóstico independentemente de outros fatores de risco (Hughes & Dobson, 2012).

Segundo Hughes e Dobson (2012) não há evidências de que a determinação da expressão do p53 por IHQ mostre grande potencial prognóstico nos TMFs.

Zappulli et al (2015) não encontraram correlações entre a expressão de p53 e o grau histológico, o estatuto RE e a expressão de HER-2.

1.2.6 Prognóstico

O prognóstico depende de diferentes fatores como a idade, a raça, o tamanho tumoral, a presença de metástases e o grau de malignidade.

Tal como referido anteriormente, alguns estudos apontam para que gatos domésticos de pêlo curto têm prognóstico significativamente melhor do que gatos de raça pura. A raça siamesa também mostra ter pior prognóstico do que as gatas domésticas de pêlo curto. Ainda assim, a raça não é unanimemente considerada como fator de prognóstico (Sorenmo et al., 2013)

Em relação ao tamanho, os tumores podem ser classificados em três categorias de volume/tamanho que ditam o prognóstico: inferior a 8 cm³ ou inferior a 2 cm de diâmetro; entre 8 e 27 cm³ ou entre 2 a 3 cm de diâmetro e maior do que 27 cm³ ou superior do que 3 cm de diâmetro (Sorenmo et al., 2013).

Zappulli et al. (2015) observaram gatas com tumores com tamanho <2 cm apresentaram tempo livre de doença (TLD) de 1600 dias e TS de 2500 dias; gatas com tumores com 2 a 3 cm apresentaram 1200 dias de TLD e 1300 dias de TS e gatas com tumores superiores a 3 cm tiveram 800 dias de TLD e 1000 dias de TS.

Com base no tamanho do tumor e considerando que o animal é submetido a uma mastectomia para remoção da lesão, Sorenmo et al. (2013) concluíram que as gatas com tumores inferiores a 2 cm apresentam uma TS de três anos; gatas com tumores entre 2 e 3 cm tem uma sobrevida média de dois anos; e gatas com lesões superiores a 3 cm tem uma esperança media de vida de apenas seis meses.

Sem surpresa, alguns estudos apontam para que a presença de metástases no linfonodo regional encurta significativamente a esperança de vida (Sorenmo et al., 2013).

Como já foi referido anteriormente, quanto maior for o grau de malignidade, maior é o índice mitótico e a proliferação celular, estando associado a um pior prognóstico (Coelho, 2013).

1.2.7 Terapêutica

1.2.7.1 Cirurgia

A cirurgia continua a ser o tratamento de eleição em cadelas e em gatas com tumores mamários exceto, em situações, em que haja metástases distantes que podem ser verificadas através da realização de um Raio-X torácico pré-operatórios (Misdorp, 2002).

Segundo Misdorp (2002), para avaliar o animal devem ser verificados os sinais clínicos, a condição geral, o ritmo de crescimento tumoral, a recorrência, o tamanho, a localização, a consistência, o número de glândulas envolvidas, a presença de ulceração, a aderência à pele ou ao músculo, o aumento do linfonodo regional, a deformação do teto e a presença de metástases distantes. A cirurgia deve ser realizada o mais atempadamente possível, seguida de avaliação histopatológica, uma vez que o seu atraso permite a evolução da doença, com aumento da massa ou a sua fixação a estruturas adjacentes. A nodulectomia deve ser restrita a tumores inferiores a 5 mm, firmes e que não estejam fixos. A mastectomia simples é indicada se apenas estiver presente uma massa na primeira glândula torácica, uma vez que não há ligação linfática para as outras glândulas. No entanto, o mesmo autor refere que estas duas abordagens apresentam uma alta incidência de recorrência comparativamente à mastectomia

total unilateral, no caso dos tumores malignos e com invasão linfática. Durante a recessão de glândulas caudais, seja regional ou da cadeia completa, devem ser removidos os linfonodos inguinais superficiais. Os linfonodos axilares devem ser removidos apenas se houver suspeita de metástases. Na gata, a cirurgia de eleição é a remoção de toda a cadeia mamária porque reduz significativamente a recorrência. (Misdorp, 2002).

1.2.7.2 Quimioterapia

A combinação de doxorubicina com ciclosfosfamida mostrou boa resposta em 50% das gatas com doença metastática e não operável (Misdorp, 2002; Sorenmo et al., 2013).

A utilização de quimioterapia adjuvante é baseada na avaliação do animal de acordo com os parâmetros indicados na Tabela 3.

Tabela 3. Fatores de prognóstico e indicadores para quimioterapia adjuvante em TMFs malignos (Adaptado de Sorenmo et al., 2013).

TUMOR SIZE	LYMPH NODE INVOLVEMENT	HISTOPATHOLOGIC PARAMETERS	INDICATION FOR CHEMOTHERAPY –(NO) OR +(YES)
<2 cm/8 cm ³	Negative	Carcinoma	– + [†]
2-3 cm/8-27 cm ³	Negative	Carcinoma	– + [†]
>3 cm/27 cm ³	Negative	Carcinoma	+
Any	Positive	Carcinoma	+

Legenda: † Invasão vascular e alto grau mostraram ser fatores de prognóstico negativos independentes em análises multivariadas.

1.2.7.3 Radioterapia

Nesta espécie não é utilizada a radioterapia uma vez que não há dados de que a radiação aumente a taxa de sobrevivência em gatas com TMFs e, por ser, uma prática bastante dispendiosa (Caixinha, 2011).

2 **VEGF**

A vasculatura sanguínea e linfática é formada por dois processos distintos: a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese consiste na formação de novos vasos a partir de células precursoras hematopoiéticas e ocorre predominantemente na embriogênese. A angiogênese, por outro lado, é a formação de vasos a partir de vasos pré-existentes (Cébe-Suarez, Zehnder-Fjällman & Ballmer-Hofer, 2006). Para além das situações fisiológicas, a angiogênese ocorre também em situações patológicas como o crescimento tumoral, as retinopatias, a arterite reumatoide, a psoríase, entre outras (Kliche & Waltenberger, 2001).

O VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) é um fator que pertence a uma família de proteínas reguladoras do crescimento e da diferenciação de múltiplos componentes do sistema vascular durante a embriogênese (Ferrara, Gerber & LeCouter, 2003), a cicatrização de feridas e a manutenção da homeostase vascular (Cébe-Suarez et al., 2006).

2.1 Família VEGF

A família deste fator inclui seis membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (também chamada de *orf vírus VEGF*), VEGF-F (encontrado em venenos de cobras) e PLGF (*placental growth factor*) como representado na Figura 2 (Kliche & Waltenberger, 2001; Cébe-Suarez et al., 2006).

São secretados como glicoproteínas diméricas e todos contêm oito resíduos de cistina. A porção do ligando é formada por um homodímero ligado covalentemente por duas pontes dissulfureto. O VEGF usa predominantemente interações hidrofóbicas para se ligar com os seus recetores (Kliche & Waltenberger, 2001).

O VEGF-A é responsável pelo crescimento vascular e os VEGF-C e -D regulam a angiogénese linfática (Ferrara et al., 2003).

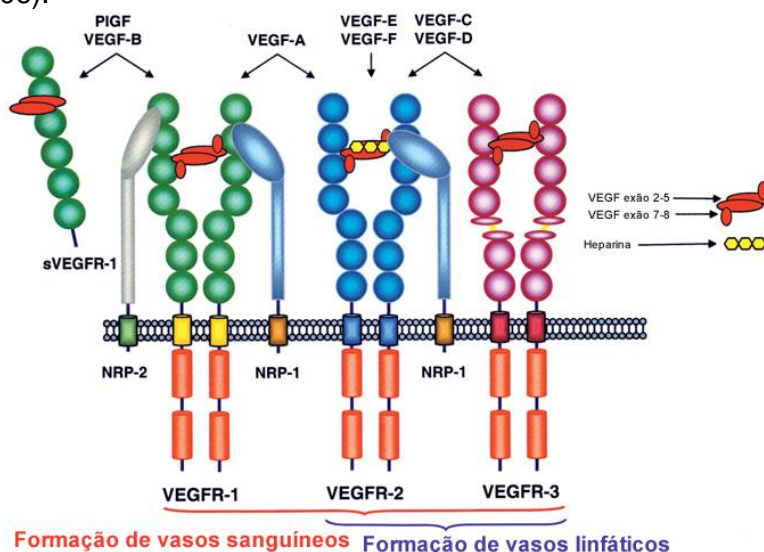
O gene VEGF-A é composto por oito exões separados por sete intrões. O *splicing* alternativo resulta em quatro isoformas diferentes (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) tendo cada uma um número diferente de aminoácidos (Neufeld et al., 1999; Ferrara et al., 2003).

O VEGF₁₂₁ é um polipéptido ácido que não se liga à heparina, ao contrário das restantes isoformas. A VEGF₁₆₅ é uma glicoproteína homodimérica com 45 kDa que se liga à heparina, enquanto que as isoformas 189 e 206 são básicas e ligam-se à heparina com elevada afinidade (Ferrara et al., 2003).

As isoformas 189 e 206 são quase completamente retidas pela matriz extracelular, a isoforma 121 difunde-se livremente e a 165 tem propriedades intermédias (Ferrara et al., 2003).

A expressão do gene VEGF é regulada por vários estímulos como a hipóxia, fatores de crescimento, genes supressores tumorais, oncogenes, NO (óxido nítrico) e HER-2 (Marty & Pivot, 2008).

Figura 2. Representação esquemática da família VEGF e seus recetores (adaptado de, Cébe-Suarez et al., 2006).



2.2 Recetores

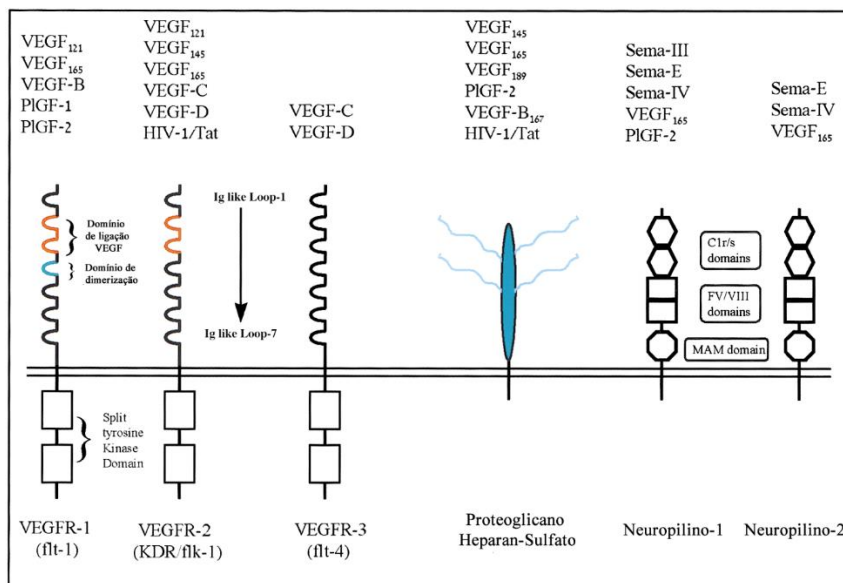
O VEGF-A liga-se a dois recetores tirosina cinase (RTKs), o VEGFR-1 (Flt-1) e o VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Estes recetores consistem em sete domínios extracelulares tipo imunoglobulina (*immunoglobulin-like*), um domínio transmembranar, um domínio regulador justamembranar, um domínio tirosina cinase intracelular interrompido por um péptido curto, um domínio cinase de inserção, seguido de uma sequência com vários resíduos tirosina envolvidos em recrutar moléculas de sinalização (Cébe-Suarez et al., 2006).

Estes recetores são expressos na superfície de células como as células hematopoiéticas, macrófagos, células endoteliais e em algumas células malignas (Cébe-Suarez et al., 2006).

O VEGFR-3 (Flt-4) é um membro da família de recetores mas não se liga ao VEGF-A, ligando-se apenas aos VEGF-C e -D. Além destes recetores, o VEGF interage também com co-recetores, nomeadamente as neuropilinas (NRPs), os proteoglicanos o heparano-sulfato, as integrinas e as caderinas (Cébe-Suarez et al., 2006), como indicado na Figura 3.

O recetor VEGFR-1 liga-se a VEGF-A, VEGF-B e PLGF enquanto que o VEGFR-2 liga-se a VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (Kliche & Waltenberger, 2001).

Figura 3. Fatores de crescimento e recetores da família VEGF (adaptado de Neufeld et al., 1999).



Os RTKs são ativados por dimerização mediada pelo ligando. Alguns estudos apontam para que a ligação não é diretamente responsável pela dimerização mas pode induzir mudanças conformacionais no 4º domínio “tipo imunoglobulina” que promove então a dimerização do recetor (Cébe-Suarez et al., 2006).

2.2.1 VEGFR-1

O VEGFR-1 é uma glicoproteína com 180 kDa expressa em diversas células hematopoiéticas com a finalidade de regular a morfogênese de vasos sanguíneos (Cébe-Suarez et al., 2006). Este recetor é necessário para o desenvolvimento de vasos sanguíneos durante a embriogénese uma vez que tem a capacidade de recrutar células hematopoiéticas de percursores medulares (Cébe-Suarez et al., 2006).

Há ainda indícios que apresenta um papel essencial durante a angiogénese patogénica e na cura de feridas, uma vez que vai potenciar a sinalização do VEGFR-2 (Cébe-Suarez et al., 2006). No entanto, outros autores indicam que há evidências claras de que o VEGFR-1 funciona como um regulador negativo do VEGFR-2 (Kliche & waltenberger, 2001).

Em suma, as funções bem estabelecidas deste recetor incluem a migração e a diferenciação de monócitos, o recrutamento de percursores de células endoteliais da medula, a migração e a invasão de células carcinomatosas, a produção de fatores de crescimento por células endoteliais sinusoidais e a adesão de células “*natural killer*” a células endoteliais (Cébe-Suarez et al., 2006).

2.2.2 VEGFR-2

O VEGFR-2 é uma glicoproteína de 200 kDa expressa em diversas células tais como as células hematopoiéticas, as neurais e as da retina. É o recetor predominante na sinalização angiogénica (Goel & Mercurio, 2013).

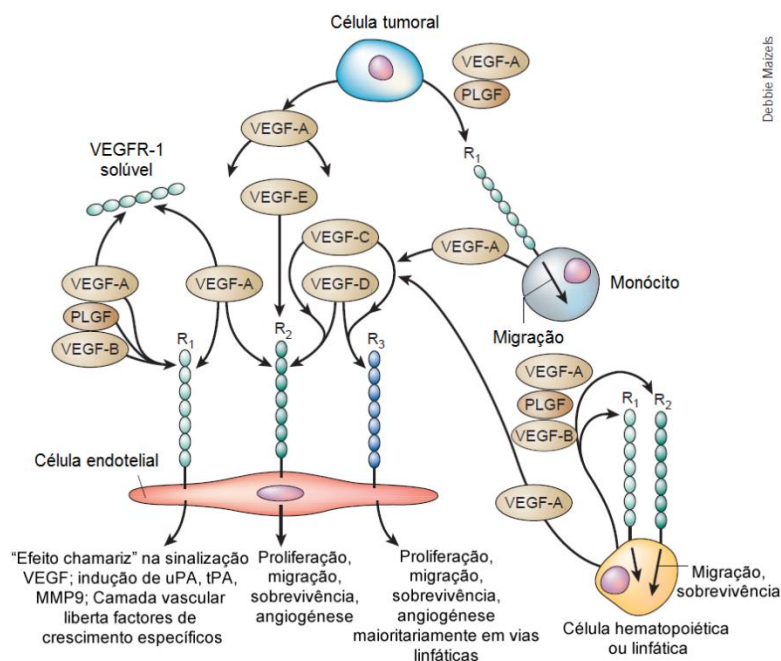
O VEGF apresenta mais afinidade para o VEGFR-1 do que para o VEGFR-2, mas a sinalização é mais fraca. Assim, concluiu-se que o recetor VEGFR-1 poderá servir para regular a sinalização do VEGFR-2, sequestrando o VEGF (Goel & Mercurio, 2013).

Este recetor regula a migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência de células endoteliais bem como a permeabilidade e dilatação de vasos (Cébe-Suarez et al., 2006), como está ilustrado na Figura 4.

2.2.3 VEGFR-3

É um recetor de 195 kDa e a sua expressão vai estimular a formação de veias e vasos linfáticos e não de artérias. Este recetor é ativado pela VEGF-C e VEGF-D e promove a migração e a sobrevivência celular dos endotélis linfáticos (Cébe-Suarez et al., 2006).

Figura 4. Papel dos recetores do VEGF em diferentes linhas celulares (adaptado de Ferrara et al., 2003).



Legenda: R1: VEGFR-1; R2: VEGFR-2; R3: VEGFR-3.

O papel dos recetores tirosina cinase do VEGF é diferente consoante o tipo celular. R1 e R2 são expressos na superfície celular da maioria das células endoteliais sanguíneas, enquanto o R3 é apenas expresso em células endoteliais linfáticas. O VEGF-A liga-se ao R1 e R2 enquanto que o PLGF e o VEGF-B interagem apenas com R1. O VEGF-E é um agente seletivo para o R2. Os VEGF-C e -D ligam-se ao R2 e R3. Há indício que R2 é o mediador principal da mitogénese e sobrevivência das células endoteliais, bem como da angiogénese e permeabilidade microvascular. Em oposição, o R1 não medeia um sinal mitogénico efetivo nas células endoteliais e pode, especialmente durante a embriogénese, ter um papel inibidor por sequestrar o VEGF e impedir a interação com o R2. Tal efeito chamariz pode ser realizado por um R1 solúvel. Contudo, R1 tem um papel de sinalização na quimiotaxia dos monócitos. Também, em células estaminais hematopoiéticas ou leucémicas, ambos R1 e R2 podem mediar a quimiotaxia e a sobrevivência do sinal.

2.2.4 Outros recetores

A sinalização do VEGF é complexa pelo facto dos seus ligandos e recetores interagirem com proteínas celulares adicionais como neuropilinas, proteoglicanos heparano-sulfato, integrinas e caderinas.

As isoformas do VEGF-A, como o VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ interagem com as neuropilinas e com os proteoglicanos heparano-sulfato.

As Neuropilina-1 e Neuropilina-2 interagem com o VEGFR-2 e -1 respetivamente, estimulando a sinalização desses recetores (Cébe-Suarez et al., 2006).

A interação do VEGF₁₆₅ com a neuropilina-1 é muito importante para a orientação celular nos endotélis, enquanto que os proteoglicanos heparano-sulfato e as neuropilinas ligam-se ao VEGF mas não parecem induzir respostas biológicas por si só, sem a presença dos RTKs (Neufeld et al., 1999).

As integrinas têm um papel fundamental na sinalização celular, uma vez que formam complexos com os RTKs para aumentar a afinidade destes recetores ao VEGF (Goel &

Mercurio, 2013). Como exemplo desta ação, integrinas específicas ligam-se ao domínio extracelular do VEGFR-2 para aumentar a sinalização do recetor quando estimulado pelo VEGF. A sinalização deste recetor pelas integrinas regula a angiogénese e a linfangiogénese durante a reparação tecidual (Cébe-Suarez et al., 2006).

As integrinas funcionam então como “porteiros”, prevenindo estimulações aberrantes de células endoteliais em repouso ou como “tutoras”, facilitando a angiogénese durante a reparação vascular em caso de doença (Cébe-Suarez et al., 2006).

As caderinas estão envolvidas na formação de junções de adesão em células endoteliais e epiteliais e têm um papel essencial na sinalização do VEGF. Quando há elevada densidade celular, uma fosfatase associa-se à caderina e atenua a fosforilação da tirosina do centro ativo do VEGFR-2, suprimindo assim o sinal. Quando existe baixa densidade celular, como no desenvolvimento de vasos sanguíneos, o VEGFR-2 associa-se à integrina em vez da caderina e o sinal é direccionado no sentido da estimulação da migração celular e mitogénese (Cébe-Suarez et al., 2006).

2.3 Funções da VEGF em condições fisiológicas

2.3.1 Desenvolvimento embrionário e pós-natal

Estudos em ratos mostraram que a inativação de um único alelo VEGF resulta em mortalidade embrionária. Estas observações podem indicar que o desenvolvimento do sistema cardiovascular depende da concentração de VEGF (Neufeld et al., 1999; Ferrara et al., 2003). Da mesma forma, foi demonstrado que mutações nos genes que codificam para os recetores VEGFR implicam graves alterações na formação dos vasos sanguíneos em animais homozigóticos. Embriões com falta de recetores VEGFR-2 morrem antes do nascimento uma vez que a diferenciação das células endoteliais não ocorre e os vasos não se formam (Neufeld et al., 1999).

A inibição parcial do VEGF resulta num aumento da mortalidade, atrofia do crescimento e comprometimento do desenvolvimento dos órgãos. A administração de uma proteína VEGFR-1 quimérica que resulta na inibição quase completa de VEGF, provoca uma paragem do crescimento quando o tratamento é realizado entre o dia 1 e dia 8 pós-natal. Este tratamento conduz ainda a uma falha renal (Ferrara et al., 2003).

2.3.2 Crescimento do esqueleto e formação óssea endocondral

A formação óssea endocondral é essencial para o crescimento de ossos longos. O mRNA do VEGF é expresso por condrócitos hipertróficos na placa de crescimento epifisária, sugerindo que é necessário um gradiente de VEGF para um crescimento direcional e uma invasão de vasos metafisários na cartilagem. Usando o mesmo VEGFR-1 quimérico referido anteriormente (ver cap. 2.3.1), verificou-se que a invasão de vasos sanguíneos na formação

óssea é quase completamente inibida. Apesar da proliferação, diferenciação e maturação dos condrócitos ser aparentemente normal, a reabsorção de condrócitos hipertróficos foi inibida, pelo que se observou uma expansão marcada da zona de condrócitos hipertróficos (Ferrara et al., 2003).

2.3.3 Angiogénese ovárica

O crescimento folicular e o desenvolvimento do corpo lúteo estão dependentes da proliferação de novos capilares. Após o desenvolvimento destas estruturas, há regressão capilar, havendo assim uma ação coordenada entre fatores indutores e inibidores, nesta angiogénese. Alguns estudos mostram que os inibidores do VEGF suprimem a angiogénese lútea e atrasam o crescimento folicular. Foi descoberto ainda um VEGF glandular (EG-VEGF) que permanece expresso após a ação do VEGF inicial das fases lúteas (Ferrara et al., 2003).

2.4 Funções da VEGF em condições patológicas

2.4.1 Síndromes neovasculares intraoculares

A diabetes mellitus e a oclusão da veia central da retina ou prematuridade com subsequente exposição a oxigénio, podem estar associadas a neovascularização intraocular que pode resultar em hemorragias vítreas, descolamento da retina, glaucoma neovascular e cegueira. Todas estas situações estão associadas a isquémia da retina. Foi também demonstrado o envolvimento do VEGF na neovascularização intraocular (Ferrara et al., 2003).

2.4.2 Inflamação e edema cerebral

O VEGF está envolvido em diversas alterações inflamatórias e condições em que haja aumento da permeabilidade e angiogénese microvascular.

Estudos em ratos mostraram que quando é induzida uma isquémia cerebral focal, há aumento dos níveis de VEGF e dos seus recetores (Ferrara et al., 2003).

2.4.3 Patologias do trato reprodutivo feminino

Como referido anteriormente, o VEGF e EG-VEGF atuam durante as fases lúteas. Alguns estudos apontam para que estes fatores também cooperem nas situações de hiperplasia e de hipervascularidade do síndrome do ovário poliquístico. A angiogénese é também importante na endometrite e, como tal, os níveis de VEGF estarão aumentados (Ferrara et al., 2003).

2.5 VEGF tumoral

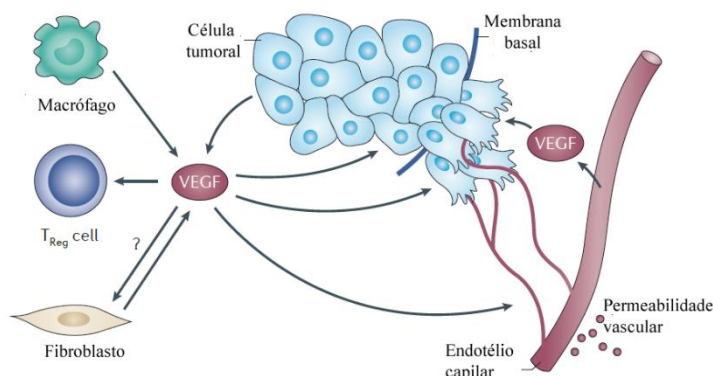
Nas neoplasias, o VEGF é secretado por células tumorais, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, pelo que vai exercer várias funções tais como estimular a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos, e aumentar a permeabilidade vascular e também afetar a

função de células imunitárias que estão presentes no tumor, alterando assim a resposta do hospedeiro a esta neoplasia (Goel & Mercurio, 2013).

A sua função passa, inicialmente, por estimular a angiogénese que é um processo que envolve a capacidade dos recetores de VEGF estimularem a sinalização que induz a proliferação e a migração de células endoteliais e a degradação e remodelação da matriz extracelular. O VEGF secretado nestas células tumorais (VEGF autócrino) promove a diferenciação celular e uma transição do fenótipo epitelial para mesenquimatoso (EMT) com um consequente aumento de invasão tumoral e sobrevivência celular. A EMT caracteriza-se por uma perda da expressão ou da função da E-caderina e sobre-expressão de proteínas mesenquimais, características associadas a uma doença mais agressiva (Mercurio et al., 2005).

Assim, a sinalização do VEGF autócrino e parácrino (por estímulos externos) em células tumorais regula aspetos chave da tumorigénese, especificamente na função de células estaminais cancerígenas, e atua no recrutamento de células T reguladoras para inibir a resposta imunitária anti-tumoral como esquematizado na Figura 5 (Goel & Mercurio, 2013).

Figura 5. Função do VEGF em tumores (adaptado de Goel & Mercurio, 2013).

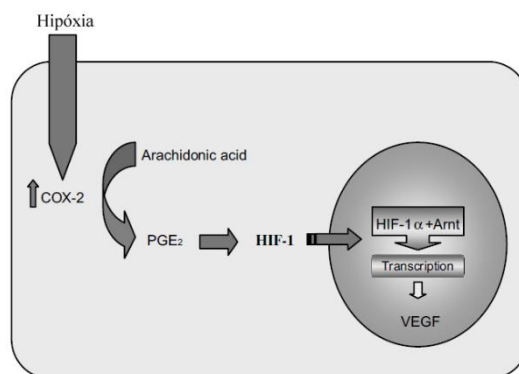


O VEGF que é secretado pelo tumor e pelas células do estroma, incluindo macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, tem diversas funções no ambiente tumoral, que envolvem a capacidade do VEGF interagir com recetores VEGF expressos em diferentes células. O VEGF na angiogénese ativa os recetores de VEGF que vão ativar vias de sinalização que induzem a proliferação e migração de células endoteliais, e que permitem a essas células degradarem e remodelarem a matriz extracelular. Esses processos culminam na angiogénese e vasculogénese. O VEGF pode também aumentar a permeabilidade vascular, que resulta na deposição de uma matriz de fibrina que forma o estroma desmoplástico. Por oposição, o VEGF secretado por células tumorais funciona de forma autócrina e promove a diferenciação e transição do fenótipo epitelial para mesenquimatoso com consequente aumento de invasão e sobrevivência tumorais. O VEGF pode ainda funcionar como um quimioatrato para recrutar células T reguladoras que inibem uma resposta imunitária anti-tumoral. A neuropilina-1 que é expressa nos fibroblastos tumorais pode contribuir para o crescimento tumoral pela formação de fibrilas de fibronectina, mas não é sabido se esse processo envolve o VEGF.

Para que haja migração celular é necessário também a produção de NO, produção essa induzida pelo VEGF-A (Kliche & Waltenberger, 2001). O NO estabiliza ainda o fator indutor de hipóxia, que é um mediador de expressão de VEGF (Islam et al., 2012). A hipóxia presente nos ambientes hipóxicos tumorais é um dos fatores que estabelece a sinalização autócrina de

VEGF (Mercurio et al., 2005). Essa hipóxia é mediada pela COX-2 como representado na Figura 6 (Rahman & Toi, 2003).

Figura 6. Papel da hipóxia nos níveis de expressão do VEGF (adaptado de Rahman & Toi, 2003).



A hipóxia regula a Cox-2 (Cicloxygenase 2), que aumenta a conversão de ácido araquidônico para prostaglandina E (PGE2). A PGE2 induz a entrada do fator indutor de hipóxia (HIF-1) do citosol para o núcleo. No núcleo, o HIF-1 α liga-se ao Arnt (*aromatic hydrocarbon nuclear translocator*) e induz a transcrição do VEGF bem como de outros fatores angiogênicos.

A sinalização do VEGF autócrino em tumores reflete a importância deste fator no auto-manutenção de células tumorais, sendo assim característica de tumores mais agressivos como carcinomas pouco diferenciados (Goel & Mercurio, 2013).

Relativamente aos receptores do VEGF, os RTKs não têm ainda uma função totalmente conhecida nos tumores mamários apesar da sua sobre-expressão já ter sido descrita. Alguns estudos indicam que o VEGFR-2 não é expresso em níveis significativos nos carcinomas mamários, embora outros estudos mostrem o contrário. Já o VEGFR-1 é expresso em várias linhas celulares de carcinoma mamário e a sua expressão é considerada um marcador de pior prognóstico (Mercurio et al., 2005).

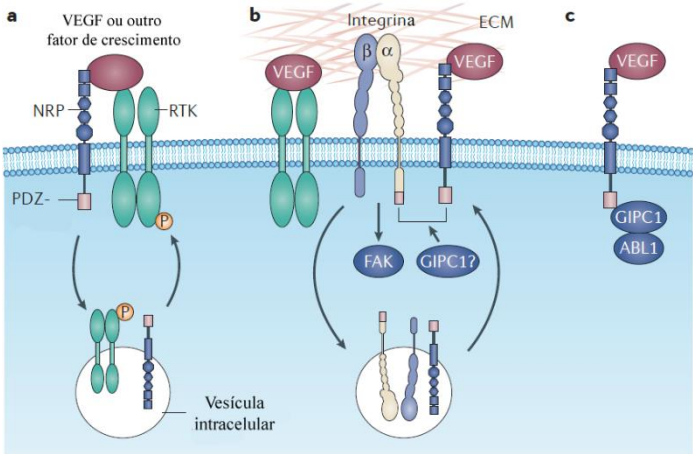
Em relação às NRPs, para além de regularem os RTKs, podem também interagir com outros fatores de crescimento ou aumentar a sinalização das integrinas em células tumorais (Goel & Mercurio, 2013).

Como vemos na Figura 7, as NRPs podem interagir de diversas formas:

- Interagem e potenciam a ação dos RTKs e de outros fatores de crescimento.
- Interagem com integrinas específicas e ativam a sua capacidade de se ligarem a ligandos da matriz extracelular.
- Podem sinalizar de forma independente.

No caso das integrinas, encontramos a integrina $\alpha 6 \beta 4$ que é expressa nas células de carcinomas invasivos e que promove a sobrevivência destas células em condições de *stress*. A sinalização desta integrina é dependente da expressão de VEGF (Mercurio et al., 2005).

Figura 7. Interações dos recetores que promovem a sinalização do VEGF em células tumorais e o papel principal das NRPs (adaptado de Goel & Mercurio, 2013).



- As neuropilinas (NRPs) interagem e potenciam a ação de sinalização dos recetores tirosina cinase (RTKs), incluindo os RTKs do VEGF. Esse modo de regulação pode estar associado com a entrada do recetor na célula e sinalização através de um compartimento intracelular. Vários fatores de crescimento, para além do VEGF, interagem diretamente com as neuropilinas, mas o autor refere que não está determinado se esta ligação é por si só suficiente para induzir resposta.
- As neuropilinas também interagem com integrinas específicas de forma a ativarem a capacidade destas se ligarem a ligandos da matriz extracelular, resultando assim numa estimulação de um sinal integrina-mediado através de adesões cinase focais (FAK). O recetor VEGFR-2 pode também funcionar de forma semelhante. Além do mais, as neuropilinas podem regular a função das integrinas por promoverem a sua reciclagem endocítica. Tanto as neuropilinas como as subunidades específicas da integrina- α contêm um domínio de ligação PDZ (domínio estrutural que inclui as proteínas PSD95, DlgA e zo-1) no seu terminal carboxilo e contêm ainda proteínas PDZ como a GIPC1, que pode promover a associação destas duas classes de recetores.
- As neuropilinas podem sinalizar de forma independente, possivelmente por usarem os seus domínios de ligação PDZ para se associarem a moléculas sinalizadoras como o ABL1.

Segundo Goel e Mercurio (2013), o VEGF e seus recetores foram identificados em diversos tumores, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Expressão de VEGFs e recetores de VEGF em tumores humanos.

VEGF ou recetor	Cancro
VEGFs	
VEGF-A	Bexiga, cérebro, mama, cólon, gástrico, escamoso oral, pulmão, mesotelioma, leucemia mieloide, ovário, pancreático, próstata.
VEGF-B	Mama, pulmão.
VEGF-C	Mama, útero, cólon, gástrico, escamoso oral, pulmão, próstata.
VEGF-D	Cérvix, gástrico, pulmão.
PLGF	Mama, cólon, gástrico, hepatocelular.
VEGF recetores	
VEGFR-1	Bexiga, cérebro, mama, cólon, cabeça e pescoço, pulmão, melanoma, mesotelioma, leucemia mieloide, esófago, ovário, pâncreas, próstata.
VEGFR-2	Bexiga, cérebro, mama, cérvix, cólon, endometrial, gástrico, cabeça e pescoço, hepatocelular, pulmão, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiplo, leucemia mieloide, esófago, ovário, pâncreas, próstata, carcinoma renal, tiroide.
VEGFR-3	Mama, cérvix, cólon, gástrico, cabeça e pescoço, pulmão, esófago, próstata.
NRP1	Cérebro, mama, cólon, pulmão, melanoma, ovário pâncreas, próstata.
NRP2	Bexiga, mama, cólon, melanoma, ovário, pâncreas, próstata, renal.

2.6 VEGF em tumores mamários

Como já foi referido anteriormente, o VEGF tem uma função angiogénica na formação e no desenvolvimento de tumores. As suas funções em tumores mamários são diversas, e nestas estão incluídas o aumento da permeabilidade vascular, autossuficiência celular (crescimento, sobrevivência e invasão), inibição da apoptose e indução da expressão de proteínas anti-apoptóticas, supressão de uma resposta imune ao tumor, migração celular e metastização (Mercurio et al., 2005; Marty & Pivot, 2008).

Até então foram identificados vários VEGFs e recetores em carcinomas mamários como: VEGF-A, -B, -C, PLGF, VEGFR-1, -2, -3 e NRP-1 e -2.

No estudo realizado por Mercurio et al. (2005) verificou-se que as células de cancro mamário metastático apresentaram o NRP-1 como recetor do VEGF₁₆₅ autócrino e que a abolição da expressão do NRP-1 resulta num aumento da apoptose.

Vários estudos mostram que o VEGF se encontra aumentado em pacientes com doença metastática (Benoy et al., 2002), enquanto outros mostram que níveis elevados de VEGF em pacientes com cancro estão associados a pior prognóstico (Co-skun et al., 2003). Assim, pensa-se que níveis elevados de VEGF diminuem a possibilidade do paciente vir a beneficiar de terapias coadjuvantes (Stathopoulos et al., 2010).

Para melhor entender o papel do VEGF nos tumores mamários da mulher, será feita uma revisão dos estudos que usaram o tecido e o soro como amostra biológica para avaliação deste fator.

2.6.1 Tecido

Segundo Maae et al. (2011), a imunohistoquímica (IHQ) para o VEGF pode ser avaliada semi-quantitativamente por dois *scores* diferentes:

1. Um *score* tendo em conta a intensidade de marcação na globalidade de tecido avaliado que inclui 3 níveis (1 = pouco ou nada marcado; 2 = marcação moderada; 3 = marcação forte).
2. Um *score* combinado que inclui o *score* de intensidade (informação quantitativa) e resulta em 4 categorias: 1 = <10% de tumor com marcação forte; 2 = 10% a 1/3 do tumor com marcação forte; 3 = 1/3 a 2/3 do tumor com marcação forte; 4 = mais de 2/3 do tumor com marcação forte.

Em 1994, Toi et al. realizaram um estudo de IHQ em tumores mamários primários. Concluíram que há uma boa relação entre a expressão de VEGF e o aumento da densidade microvascular (MVD). Concluíram ainda que o TLD de pacientes com tumores com sobre-expressão de VEGF é significativamente menor do que em pacientes com tumores com menor expressão de VEGF. Sugeriu-se então que a VEGF está intimamente associada à angiogénese e a um TLD mais curto.

Mais tarde, em 1997, Obermair et al. (1997) realizaram um estudo semelhante onde concluíram que as concentrações de VEGF são significativamente superiores em tumores mamários invasivos do que em fibromas ou tecidos epiteliais mamários normais. Apesar de terem encontrado uma correlação positiva entre as concentrações de VEGF e a MVD como no estudo anterior, não encontraram relação entre a concentração de VEGF e o TLD. Não foram também encontradas diferenças de expressão do recetor VEGFR-1 em tecidos tumorais e saudáveis.

Recentemente, Mylona et al. (2007) estudaram o valor de prognóstico do VEGF-A e -B e do recetor VEGFR-1 em carcinomas mamários. Concluíram que o VEGF-A está correlacionado com a localização do VEGFR-1 nas células tumorais. Não encontraram correlações entre os marcadores estudados e qualquer um dos parâmetros clínico-patológicos ou recetores hormonais, exceto para a localização do VEGFR-1 no estroma, que teve uma correlação inversa com a localização do RP. Encontraram ainda uma relação do VEGF-A e do VEGFR-1 com a localização do p53. Em relação ao VEGF-B, encontraram relação com HER-2. Não encontraram nenhuma significância de prognóstico para os níveis de expressão de VEGF-A, enquanto que a sobre-expressão do VEGF-B mostrou pouca relação com TLD e TS favoráveis em pacientes com metástases nos linfonodos. Estes autores demonstraram ainda que a sobre-expressão de VEGFR-1 afeta negativamente o TS de pacientes com tumores p53 positivos e que de todos os marcadores que estudaram, apenas o VEGFR-1 mostrou ser um potencial marcador de prognóstico.

2.6.2 Sangue

Para determinar a concentração de sVEGF podem ser usadas técnicas como o ELISA e a espectrofotometria.

Em 2002, Benoy et al. avaliaram as concentrações de VEGF no soro (sVEGF) e no plasma (pVEGF) de pacientes com doença local e doença avançada de TMs e correlacionaram também com a percentagem de plaquetas. Neste estudo foi encontrada uma forte correlação entre os níveis de sVEGF e o número de plaquetas circulantes, pelo que os autores sugeriram que as plaquetas possam atuar como transportadoras de VEGF. Verificaram também que o grupo controlo apresentava valores de sVEGF e de pVEGF significativamente menores do que o grupo de doentes.

Em 2003, Coskun et al. mostraram que pacientes com doença metastática apresentavam valores superiores de VEGF no soro comparativamente aos pacientes com doença não metastática e mulheres saudáveis. Apesar destes achados, não encontraram diferenças significativas entre o grupo dos doentes não metastáticos e o grupo dos pacientes com doença avançada. Neste estudo fizeram também a deteção de NO que tem sido apresentado como um agente bioativo que produz muitos efeitos na carcinogénese, incluindo a indução da angiogénese e metastização. O aumento da atividade de NO é necessária para o VEGF

estimular a angiogénese e a permeabilidade vascular e o NO é produzido pelas células endoteliais através da estimulação pelo VEGF. No estudo de Coskun et al. (2003) observou-se uma correlação positiva entre os valores de VEGF e valores séricos de nitrato+nitrito em doentes metastáticos, confirmando a associação do VEGF com o NO na carcinogénese.

Duranyildiz et al. (2009) estudaram os valores de sVEGF em pacientes com tumor mamário no início de doença, ou seja, estadios I e II. Neste estudo não encontraram nenhuma diferença nos valores de sVEGF entre pacientes e controlos, concluindo que a concentração de sVEGF não é bom parâmetro de diagnóstico em estadios iniciais da doença.

Em 2010, Stathopoulos et al. concluíram que os valores de sVEGF, seja em controlos, pacientes com metástases ou sem, variam extensivamente e não apresentam uma correlação evidente, tendo concluído que, com esta variação extensiva, o VEGF não é um bom biomarcador.

Rykala et al. (2011) recolheram sangue e tecido tumoral para analisar e verificaram que os valores de VEGF estavam elevados nos dois tipos de amostra nos pacientes com cancro quando comparados com pacientes com doença benigna. Mostraram também que há níveis mais elevados de VEGF em tumores RE positivos e em doentes com o linfonodo regional afetado. Verificaram ainda que tumores com níveis elevados de VEGF estão associados a progressão de doença com formação de metástases à distância.

Em 2011, Pande et al. avaliaram a concentração de sVEGF por espetofotometria em pacientes com carcinoma mamário em estadio II e III e concluíram que os valores de sVEGF estão aumentados nestes doentes. Propuseram então que os níveis aumentados de sVEGF, a sua correlação positiva com o *stress* oxidativo e a diminuição de antioxidantes, sugerem uma ligação entre o *stress* oxidativo e a transformação maligna da doença.

Mais recentemente, Hodorowicz-Zaniewska et al. (2012) tentaram encontrar uma relação entre os níveis séricos de VEGF e diferentes parâmetros histopatológicos como o estadio, o tamanho, a presença de metástases no linfonodo regional, a malignidade, a angioinvasão, o tipo de neoplasia, o tipo histológico e a expressão de recetores (RE, RP e HER-2). Não foram encontradas nenhuma correlações entre doentes e pacientes saudáveis e entre os níveis de VEGF e qualquer um dos parâmetros estudados.

Em 2012, Perez-Rivas et al. decidiram estudar a influência da cirurgia em diversas proteínas presentes no soro de pacientes com cancro mamário. Assim, recolheram sangue antes e depois da cirurgia (24h). Concluíram que os valores de VEGF-A antes da cirurgia estão mais elevados em mulheres saudáveis e em pacientes com tumores não invasivos do que em pacientes com tumores invasivos. Detetaram ainda um aumento do VEGF-B após a cirurgia. Thielemann et al. (2013) avaliaram o sVEGF e os seus recetores (VEGFR-1 e VEGFR-2) em pacientes com cancro mamário. Concluíram que as pacientes com tumores malignos apresentaram um valor de sVEGF seis vezes superior ao grupo controlo. Também detetaram que a concentração plasmática dos recetores é superior em pacientes do que nos controlos.

As concentrações de VEGF, VEGFR-1 e -2 aumentam em conjunto com a progressão da doença. O valor de sVEGF em mulheres no estadio III foi duas vezes superior ao valor da concentração de sVEGF em mulheres no estadio II e três vezes maior ao valor encontrado nas mulheres doentes no estadio I. Estes investigadores detetaram ainda valores mais elevados de sVEGF e dos seus recetores, em mulheres com o linfonodo axilar afetado relativamente às pacientes que não apresentaram metástases. Mostraram ainda que existia uma correlação positiva entre a concentração de sVEGF e de sVEGFR-2 e o tamanho do tumor. No entanto, não encontraram relação entre a concentração sérica de VEGFR-1 e o tamanho do tumor.

No mesmo ano, Zhang et al. (2013) concluíram que a deteção de sVEGF juntamente com outros marcadores poderá auxiliar no diagnóstico, no tratamento e no prognóstico do cancro mamário e, simultaneamente, o sVEGF foi considerado um biomarcador eficaz na avaliação de pacientes com doença em estado inicial.

Num estudo mais recente, Zhang et al. (2014) avaliaram as concentrações séricas do VEGF e da MMP-9 (Matriz metaloproteinase 9), em mulheres com carcinoma ductal infiltrativo. Os resultados mostraram que estas doentes apresentavam valores mais elevados destes dois marcadores do que o grupo com doença benigna e que os controlos. Simultaneamente, encontraram uma correlação positiva entre os níveis de VEGF e MMP-9 com o estadio TNM. As doentes nos estadios III e IV apresentavam valores significativamente maiores do que as doentes nos estadios II e I. Verificaram ainda que o VEGF e a MMP-9 estavam associados ao tamanho tumoral, aumentando, em paralelo, com o aumento do tamanho do tumor. Também observaram que os valores séricos destes marcadores diminuem à medida que ocorre uma redução do tamanho do tumor (após operação e/ou quimioterapia), mostrando assim que estes marcadores podem funcionar como bons indicadores no controlo da progressão da doença. Tal como foi descrito noutros estudos, estes autores também observaram que os valores séricos do VEGF e da MMP-9 são superiores em pacientes com metástases no linfonodo regional do que em pacientes sem metástases no linfonodo. Por fim verificaram que os valores de VEGF e MMP-9 no soro se relacionam entre si, indicando que a sobre-expressão do VEGF induz a expressão de níveis elevados de MMP-9.

2.7 Terapêutica anti-VEGF

O VEGF tem um papel limitado na fisiologia do adulto, com funções restritas a cicatrização de feridas e no ciclo reprodutivo feminino. Desta forma, a terapia anti-VEGF pode ser usada com efeitos secundários mínimos nos adultos, tornando-se assim um alvo para descoberta de novas terapias (Marty & Pivot, 2008).

A terapia direcionada ao VEGF, seja isolada ou em combinação com quimioterapia, é usada no tratamento de vários tipos de cancro (Goel & Mercurio, 2013). A inibição do VEGF com Bevacizumab é o método mais usado na terapia direcionada ao VEGF, sendo este agente

terapêutico um anticorpo monoclonal que inibe o VEGF-A (Goel & Mercurio, 2013). Estudos em que este fármaco foi usado para tratar pacientes com câncros avançados locais mostraram um aumento da apoptose celular. O perfil de toxicidade deste fármaco é semelhante em todos os câncros e os seus efeitos secundários incluem: hipertensão, proteinúria, hemorragia, tromboembolismo arterial e venoso, complicações na cicatrização de feridas, perfurações gástricas e falência cardíaca congestiva (Marty & Pivot, 2008).

A dose recomendada em mulheres com cancro mamário metastático é de 10mg/Kg de 2 em 2 semanas (Marty & Pivot, 2008). No entanto o Bevacizumab não inibe a interação do VEGF com os NRPs. Desta forma, a expressão tumoral de NRP1 é um fator de mau prognóstico à resposta terapêutica com Bevacizumab.

O ideal seria combinar uma terapia que incidisse sobre o VEGF com um fármaco que inibisse as NRPs. A expressão tecidual das NRPs é mínima nos tecidos adultos e, como tal, terapias direcionadas às NRPs não iriam ter grandes efeitos secundários. No entanto, em testes de terapias combinadas de Bevacizumab e MNRP1685A, um anticorpo monoclonal específico anti-NRP-1, apareceram efeitos secundários como a diminuição do número de plaquetas e o aparecimento de proteinúria (Goel & Mercurio, 2013).

Outra hipótese de terapia será o desenvolvimento de péptidos que se liguem às NRP-1 e -2 de forma a impedir a sua ação.

Estudos em ratos mostraram que inibir o VEGFR-2 provoca regressão tumoral, redução do pool de células estaminais cancerígenas e redução do MVD (Goel & Mercurio, 2013).

Vários fármacos têm sido testados de forma a encontrar novas terapias anti-VEGF eficazes (Tabela 5).

Tabela 5. Fármacos anti-VEGF disponíveis ou em desenvolvimento (Marty & Pivot, 2008).

Drug	Mechanism(s) of action	Molecular target(s)
Bevacizumab	Anti-VEGF antibody	VEGF ligand
Sorafenib (BAY 43-9006)	Tyrosine kinase inhibitor	Raf-1, VEGF receptors-2 and -3, PDGFR- β , Flt-3, c-Kit
Sunitinib (SU11248)	Tyrosine kinase inhibitor	VEGF receptors-1, -2 and -3, Flt-3, PDGFR- α , PDGFR- β , c-Kit
Vatalanib (PTK/ZK)	Tyrosine kinase inhibitor	VEGF receptors-1, -2 and -3, PDGFR- β , c-Kit, c-Fms
Vandetanib (ZD6474)	Tyrosine kinase inhibitor	VEGF receptors-2 and -3, EGFR
Motesanib (AMG-706)	Tyrosine kinase inhibitor	VEGF receptors-1, -2 and -3, PDGFR, c-Kit
Pazopanib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGF receptors-1 and -2, PDGFR- β , and c-Kit
Axitinib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGF receptors-1, -2 and -3, PDGFR, c-kit

O Malato de Sunitinib tem sido utilizado em mulheres com carcinoma mamário, sem efeitos secundários graves e com uma taxa de resposta de 14%. O Sorafenib tem sido prescrito por ter poucos efeitos secundários como agente único em pacientes com cancro mamário.

O Vandetanib não teve respostas objetivas, mas o tumor numa paciente apresentou um tamanho constante durante 24 meses.

Em suma, o VEGF é um alvo interessante para a terapêutica contra o cancro mamário uma vez que parece ser o único fator antigénico expresso conhecido durante todo o ciclo tumoral (Marty & Pivot, 2008).

2.8 VEGF nos TMFs

Em 2002 Koga et al. clonaram e sequenciaram o cADN do VEGF felino a partir de linhas celulares de linfoma felino e posteriormente avaliaram os níveis transcricionais em tecidos normais. Depois da extração do ARN total realizou-se uma operação de transcrição reversa usando um kit de cADN. Os *primers* usados foram desenhados com base na sequência do VEGF humano e canino. Posteriormente, foi então realizada a sequenciação do VEGF felino e publicada pela primeira vez (Koga et al., 2002).

De seguida, estes autores investigaram a expressão do VEGF em tecidos saudáveis felinos, incluindo o baço, o pulmão, o rim, a suprarrenal, o cólon e a pele. Previamente e de forma a validarem o uso dos anticorpos, expressaram o VEGF felino em células de mamíferos, de forma a confirmarem as reações cruzadas dos anticorpos anti-VEGF humano. Os resultados mostraram que o VEGF é expresso em vários tecidos felinos, tal como noutras espécies.

Em 2002, Millanta et al. realizaram um estudo em que se recolheram amostras de carcinomas mamários felinos e se determinou a expressão do VEGF e avaliou a MVD.

A percentagem de células tumorais positivas ao VEGF foi determinada em 5 secções ampliadas a 40X contabilizando o número de células VEGF positivas, que não se intersectassem nem fossem adjacentes. Depois, com ampliação de 400X, foram contabilizadas 100 células e determinaram as positivas, fazendo depois a média de percentagens considerando os 5 campos. Neste estudo foi usado um anticorpo anti-VEGF policlonal de coelho (A-20, Santa Cruz Biotechnology, USA), anticorpo esse que será usado no presente estudo. Millanta et al. (2002) concluíram que nos TMFs, a proporção de células VEGF positivas é maior em carcinomas sólidos e papilares do que em tumores tubulares ou quísticos. Detetaram ainda um aumento do número de células a sobre expressar VEGF em carcinomas pouco diferenciados. A sobre-expressão de VEGF mostrou-se significativamente correlacionada com o prognóstico, mas não foi observada correlação com a invasão de vasos linfáticos. A correlação entre o aumento de células positivas a VEGF e o prognóstico pouco favorável foi demonstrado por curvas de sobrevivência ($P=0.03$).

Em 2012, Islam et al. realizaram IHQ em TMFs de forma a avaliar a expressão do NO endotelial e VEGF. Concluíram que o VEGF está sobre expresso em TMFs, mostrando que está menos expresso em tumores bem diferenciados do que em pouco diferenciados.

Desta forma concluímos que o VEGF, tal como na mulher, poderá vir a ser considerado um indicador de prognóstico.

TRABALHO EXPERIMENTAL

1 Introdução

Como foi referido anteriormente, o VEGF tem sido cada vez mais estudado nos tumores mamários da mulher.

Até à presente data existem poucos trabalhos sobre a importância deste fator na gata e nenhum que tenha feito a sua deteção no soro.

De acordo com a base de sequências proteicas Uniprot, a homologia do VEGF-A felino com o VEGF-A humano é de 94% para a isoforma 165, 83% para a isoforma 189 e de 91% para a isoforma 121.

O anticorpo proposto para ser usado neste trabalho experimental (VEGF (A-20)) reconhece as isoformas 121, 165, 189 em diversas espécies animais (humano, macaco, rato, cão, gato), estando desta forma garantida a viabilidade de uso deste Ac neste trabalho experimental.

2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho incluíram a deteção de VEGF no soro sanguíneo de gatas com carcinomas mamários, através da técnica de *dot blot*, usando o anticorpo anti-VEGF (A-20, sc-152); verificar se os níveis de sVEGF são distintos entre a população de animais doentes e a população de animais saudáveis; encontrar associações estatísticas entre a concentração de sVEGF e os diferentes parâmetros histopatológicos (tamanho tumoral, TNM, presença de metástases nos linfonodos, positividade aos RE, positividade aos RP, positividade ao HER-2, Ki-67, classificação histopatológica e grau de malignidade); procurar uma associação estatística entre a quantidade de sVEGF e o estado inicial de doença, formando dois grupos de estadiamento (um grupo com animais no estadio I e II e um grupo com animais no estadio III e IV) e dois grupos de acordo com o tamanho tumoral (um grupo com tumores de tamanho T1 e T2 e outro grupo com tumores de tamanho T3).

3 Material e métodos

3.1 Amostra

Neste estudo foram usados soros sanguíneos de 49 gatas com carcinomas mamários e 18 soros sanguíneos de gatas saudáveis.

Os casos clínicos das gatas com TM foram recolhidos maioritariamente no Hospital Escolar da FMV-UL e os restantes em diversas clínicas incluindo: Clínica Veterinária Zoomédica, Clínica Veterinária MVet, Clínica Veterinária de Sintra e Hospital Veterinário da Estefânia, sendo o sangue recolhido num momento anterior à mastectomia. O sangue das gatas

saudáveis, do grupo controlo, foi recolhido no momento da OVH realizada no Hospital Escolar da FMV-UL.

Por animal foram recolhidos 1-2 ml de sangue para tubos secos (sem anticoagulante), que foram colocados no frigorífico durante 2 a 6 horas. Posteriormente, os sangues foram sujeitos a uma centrifugação a 1000 rpm, durante cerca de 10 minutos, para se proceder à separação do soro para alíquotas de 0,5 ml, que foram armazenadas a -80°C.

O acesso aos dados clínicos, nomeadamente, idade, raça e informações acerca dos TMs (tamanho, classificação histopatológica, grau de malignidade, níveis de expressão dos TMs para os RE, RP e HER-2, índice de Ki-67 e envolvimento dos linfonodos regionais) foi fornecido pela co-orientadora, uma vez que os animais utilizados neste estudo eram seguidos no âmbito do seu doutoramento.

3.2 Reagentes

Para a técnica de *Dot Blot* foram necessários os seguintes materiais:

- Membranas de nitrocelulose.
- TBS (*Tris buffered saline*): solução tampão isotónica, não tóxica para células, com uma vasta utilização em biologia molecular (em técnicas como ELISA, IHQ e *immunoblotting*), quer como agente diluidor ou como agente de lavagem. A sua preparação inclui a diluição de 50mL de TBS a 10% em 450mL de água miliQ esterilizada e a adição de 125µl de detergente *Tween 20* (0.05%).
- BSA (*Bovine serum albumin*): a albumina sérica bovina é uma cadeia polipeptídica simples, utilizada como agente de bloqueio. Foi diluída em TBS, tendo sido utilizada a 2,5%.
- Anticorpo primário: Ac policlonal anti-VEGF (A-20, sc-152, Santa Cruz Biotechnology).
- Anticorpo secundário: Ac secundário anti-coelho, acoplado a peroxidase de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, USA).
- ECL: família de reagentes quimioluminescentes, com grande sensibilidade para detetar a HRP presente no Ac secundário (Millipore®).
- Película de Raios-X: película especial para ensaios de *immunoblotting* baseados na deteção pelo ECL (Amersham Hyperfilm GE Healthcare, Tokyo, Japan).

3.3 Técnica de Dot Blot

A técnica de *Dot Blot* tem como objetivo a deteção de proteínas na amostra a analisar, cujo protocolo inclui os seguintes passos:

1. Desenho de uma grelha, a lápis, de quadrados com 1cm² na membrana de transferência;
2. Descongelação, agitação e centrifugação dos soros a analisar;

3. Pipetagem de 1µl de cada amostra no respetivo quadrado da grelha, desenhada anteriormente;
4. Secagem da membrana na estufa, a 37°C durante 1h;
5. Bloqueio da membrana através da sua incubação numa solução de BSA a 2,5% durante 30 minutos;
6. Incubação da membrana com o Ac primário (diluição 1:4000 em solução BSA a 2,5%) *overnight* (16h), a 4°C;
7. Realizar três lavagens de 10 minutos cada com tampão TBS+Tween 0,05%;
8. Incubar a membrana com o Ac secundário (diluição 1:100000 em solução TBS+Tween 0,05%), durante 30 minutos à temperatura ambiente;
9. Repetir o passo 7;
10. Incubar a membrana com ECL durante 5 minutos e remover o excesso;
11. Expor numa película de Raio-X, com vários tempos de exposição;
12. Revelar a película;
13. Fixar a película;
14. Lavagem da película de Raio-X com água quente;
15. Secar a película.

3.4 Análise das imagens obtidas em película

Para análise das películas Raio-X, estas foram digitalizadas a 200ppp numa impressora Epson XP-205 e a intensidade dos *dots* foi analisada através do programa Image J (Open Source Software, versão 1.48, National Institutes of Health, Bethesda, USA). O *background* de todas as membranas foi reduzido em 25 píxeis e procedeu-se à inversão colorimétrica para possibilitar a deteção da pixelagem correspondente a cada *dot*. Assim, procedeu-se à realização de uma grelha que incluísse a totalidade da área de cada *dot* e fez-se a medição da densidade de pixelagem, guardando os dados obtidos no programa Microsoft Office Excel® 2013.

3.5 Análise estatística

A densidade dos píxeis foi avaliada nos dois grupos (controlo e doentes), usando o programa IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM, Nova Iorque, EUA).

Uma vez que o N dos grupos foi inferior a 50, usou-se o teste estatístico de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da amostra. Uma vez verificada, foi aplicado o teste t para avaliar a relação entre estes grupos.

Dentro do grupo dos animais doentes foi realizado o teste t para verificar a existência de uma correlação entre a densidade dos píxeis e: a positividade para recetores de progesterona e de estrogénio, a positividade para o HER-2, aumento do Ki-67, a presença de metástases nos

linfonodos e o estado inicial de doença uma vez que cada categoria apresenta apenas duas classes.

Foi ainda relacionada a densidade de píxeis com: o TNM, o tamanho do tumor, o grau de malignidade do tumor e a classificação histopatológica pelo teste ANOVA, uma vez que cada parâmetro apresenta três ou mais classes.

Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 0,05.

4 **Resultados**

4.1 **Caracterização da amostra**

Neste estudo foram incluídas 14 gatas saudáveis, com idades compreendidas entre os 5 meses e os 2 anos, sendo a média de idade $1,17 \pm 0.62$ anos e 44 gatas doentes. Destas, a gata mais nova apresentava 6 anos, enquanto a mais velha tinha 19 anos, sendo a média de idades $12,18 \pm 2.90$ anos (ver capítulo “exclusão de soros hemolisados”).

Tabela 6. Distribuição das idades dos animais avaliados.

Idade	Invasivos (44) N	Controlos (14) N
<10	9	14
≥10	35	0
Idade média, anos	12	1

Em relação às características dos TMs, verificámos que o estadio TNM predominante foi o III, correspondendo a metade da amostra. Em termos de tamanho tumoral, 38,64% dos tumores foram classificados como T2 (tamanho entre 3 e 5 cm), 31,82% foram incluídos na categoria T1 (tamanho <3 cm) e 29,55% na categoria T3 (tamanho >5 cm). O grau de malignidade predominante foi o III (72,73%), seguido do grau II (20,45%) e, por último, o grau I de malignidade (4,55%).

Verificou-se ainda que mais de metade da amostra (56,82%) não apresentava metástases nos linfonodos regionais analisados e que a mesma percentagem de gatas tinham tumores RP negativos. Em relação ao RE, 36% das gatas apresentavam tumores positivos para este recetor e apenas 20,45% dos tumores eram HER-2 positivos.

Foi possível ainda verificar que 56,82% dos animais doentes apresentavam estadios avançados da doença (III e IV).

Relativamente à classificação histopatológica, todos os tumores incluídos no estudo eram carcinomas: 1 carcinoma espinocelular, 3 carcinomas papilares, 5 carcinomas mucinosos, 6 carcinomas sólidos, 6 carcinomas cribiformes, 10 carcinomas tubulares e 13 carcinomas túbulo-papilíferos

Todos os parâmetros registados estão na Tabela 7 e, mais pormenorizadamente, no Anexo 1.

Tabela 7. Características clínicopatológicas dos TMFs.

Característica	N (44)	%
TNM		
I	12	27,27
II	7	15,91
III	22	50,00
IV	3	6,82
Metástases regionais		
N0	25	56,82
N1	15	34,09
NA (não analisado)	4	9,09
Tamanho tumoral		
T1	14	31,82
T2	17	38,64
T3	13	29,55
Malignidade		
I	2	4,55
II	9	20,45
III	32	72,73
NA	1	2,27
Recetor progesterona		
Negativo	25	56,82
Positivo	19	43,18
Recetor estrogénio		
Negativo	28	63,64
Positivo	16	36,36
HER-2		
Negativo	35	79,55
Positivo	9	20,45
Índice Ki		
Baixo	11	25,00
Alto	32	72,73
NA	1	2,27
Conjunto TNM		
I e II	19	43,18
III e IV	25	56,82
Conjunto tamanho		
T1 e T2	31	70,45
T3	13	29,55
Carcinoma		
Espinocelular	1	2,27
Papilar	3	6,82
Mucinoso	5	11,36
Sólido	6	13,64
Cribiforme	6	13,64
Tubular	10	22,73
Túbulo-papilífero	13	29,55

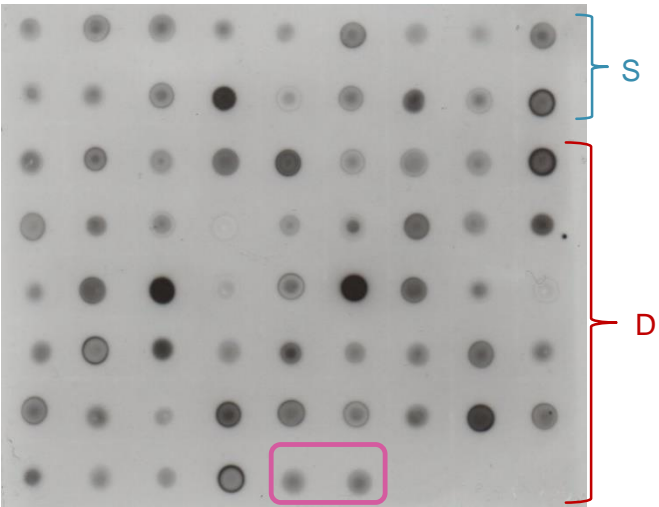
4.2 Detecção do VEGF

Após deteção do VEGF através da técnica de *dot blot*, a quantificação do VEGF no soro das gatas foi realizada através da determinação da densidade dos píxeis de cada *dot*, usando o programa ImageJ. Para melhor validar os resultados, foram analisadas 3 películas que estão representadas nas figuras 8, 9 e 10. Os valores de densidade de píxeis encontram-se discriminados no Anexo 2.

Figura 8. Ensaio final da membrana M1. Película com um tempo de exposição de 4 min.

S	S	S	S	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	R	R			

Legenda: S: 18 casos saudáveis e D: 49 casos doentes. R: 2 casos repetidos.



R

Figura 9. Ensaio final da membrana M2. Película com um tempo de exposição de 5 min.

	S	S	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S	S	S
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D		

Legenda: S: 15 casos saudáveis e D: 46 casos doentes.

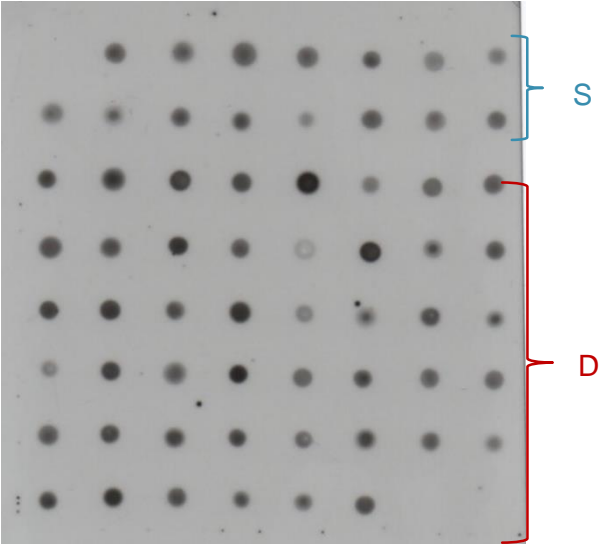
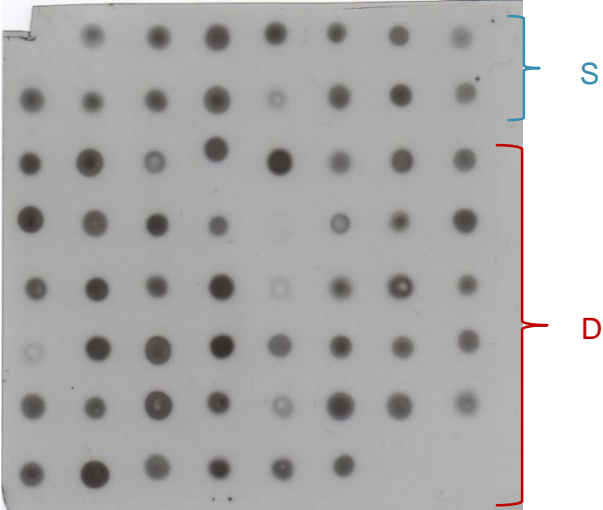


Figura 10. Ensaio final da membrana M3. Película com um tempo de exposição de 5 min.

	S	S	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S	S	S
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D		

Legenda: S: 15 casos saudáveis e D: 46 casos doentes.



4.3 Exclusão de soros hemolisados

Tendo em conta que os soros com hemólise podem resultar em falsos positivos, procedeu-se à avaliação visual de todas as amostras, no sentido de as classificar quanto ao seu grau de hemólise. Assim, os soros foram classificados como “soro não hemolisado” ou como “soro hemolisado”.

Após esta avaliação, procurou-se identificar a existência de diferenças significativas entre as concentrações de VEGF nos soros hemolisados e nos soros não hemolisados, concluindo-se que existiam diferenças significativas ($P = 0,000$). Assim sendo, foram excluídos os soros hemolisados para que estes não interferissem nos resultados, ficando a amostra final com um total de 14 casos saudáveis e 44 soros colhidos de animais com TM.

4.4 Comparação de doentes e saudáveis quanto à densidade de píxeis

Um dos objetivos deste estudo foi determinar se existe uma relação entre a quantidade de sVEGF e a presença de tumor mamário. Para tal foi realizado um teste t sobre as densidades dos *dots* para o grupo dos animais saudáveis e para o grupo de animais doentes. O resultado deste teste nas três películas encontra-se apresentado na Tabela 8, e os diagramas de caixa relativos à quantidade de sVEGF de cada grupo estão expostos nos gráficos 1, 2 e 3.

Desta forma, assumindo que um valor de P inferior a 0,05 rejeita a hipótese nula, concluímos que existem diferenças entre o grupo de doentes e de animais saudáveis.

Assim, foi demonstrado que existe uma associação entre uma maior quantidade de sVEGF (intensidade de píxeis) e a presença de tumor mamário.

Tabela 8. Comparação de resultados entre animais saudáveis e animais doentes.

VEGF (píxel)	Controlos		Doentes		P
	Média	DP	Média	DP	
M1	35106.14	16283.07	50188.36	25526.19	0.043
M2	50808.71	16385.85	65048.80	22433.93	0.033
M3	30017.36	8777.19	40188.25	14783.69	0.018

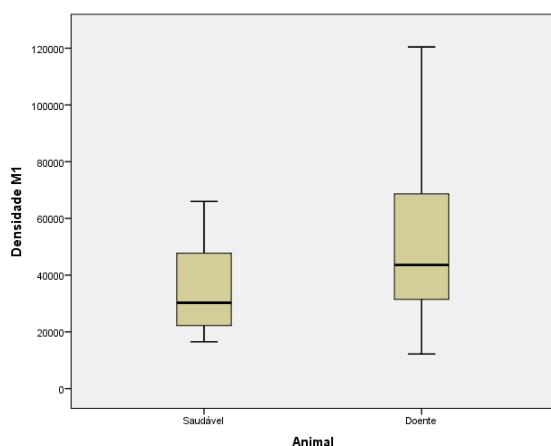


Gráfico 1. Caixa de bigodes relativa aos resultados da membrana 1.

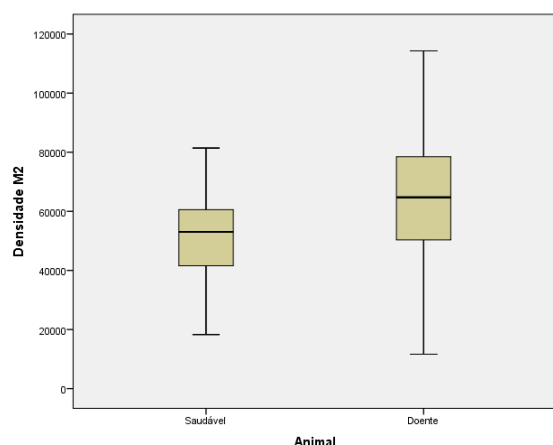


Gráfico 2. Caixa de bigodes relativa aos resultados da membrana 2.

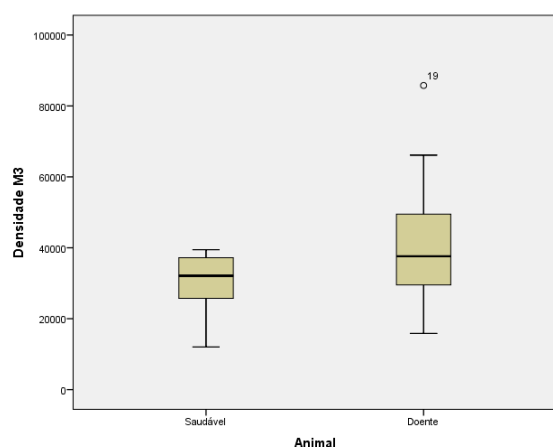


Gráfico 3. Caixa de bigodes relativa aos resultados da membrana 3.

4.5 Associação entre a concentração de sVEGF e características histopatológicas

Foram realizados os testes t e de ANOVA para determinar a relação entre a quantidade de sVEGF e os vários parâmetros histopatológicos avaliados. Os resultados destes testes estão apresentados na Tabela 9 (tabela completa no Anexo 3).

Todos os valores de *P* apresentados foram superiores a 0,05, exceto o valor de *P* para a relação entre os níveis de sVEGF e a positividade para HER-2, na membrana 2. Uma vez que nas três membranas, apenas numa o valor de *P* foi inferior a 0,05, esse resultado não será considerado.

Desta forma, não foram encontradas relações entre os níveis de sVEGF e os vários parâmetros histopatológicos avaliados, na amostra estudada.

Tabela 9. Resultados da comparação dos valores de sVEGF com os diferentes parâmetros histopatológicos.

Parâmetros (N)	M1	P	M2	P	M3	P
Estado nodal						
N1 (15)	47501.40	0.449	59425.20	0.141	36259.27	0.101
N0 (25)	54069.36		70467.88		44171.80	
Estadio TNM						
I (12)	46680.08		59971.50		42648.33	
II (7)	47730.86	0.911	66980.00	0.842	38331.57	0.884
III (22)	52104.09		67225.50		40013.41	
IV (3)	55907.00		64889.33		35962.33	
Tamanho tumoral						
T1 (14)	53719.14		62581.57		42357.64	
T2 (17)	48225.76	0.826	62028.71	0.459	36562.65	0.444
T3 (13)	48952.46		71655.15		42593.15	
Malignidade						
I (2)	40962.50		58385.50		35344.50	
II (9)	53412.11	0.828	68644.67	0.826	40783.56	0.895
III (32)	50719.28		64777.66		40431.56	
Conjunto TNM						
I e II (19)	47064.21	0.486	62553.58	0.526	41057.95	0.738
III e IV (25)	52560.44		66945.16		39527.28	
Conjunto Tamanho						
T1 e T2 (31)	50706.65	0.838	62278.39	0.210	39179.74	0.491
T3 (13)	48952.46		71655.15		42593.15	
Ki67						
Baixo (11)	54188.91	0.533	66165.55	0.859	39063.82	0.764
Alto (32)	48479.28		64728.50		40662.31	
RP						
- (25)	49980.72	0.952	65581.88	0.859	38158.56	0.302
+	50461.58		64347.37		42858.89	
RE						
- (28)	50903.07	0.809	66941.79	0.466	41954.04	0.300
+	48937.63		61736.06		37098.13	
HER-2						
- (35)	51575.83	0.484	68417.71	0.048	41250.94	0.353
+	44792.67		51947.44		36055.56	
Classificação histopatológica						
Espinocelular (1)	22637.00		54689.00		36732.00	
Papilar (3)	32964.33		39211.33		39308.67	
Mucinoso (5)	61361.00		80446.80		45703.60	
Sólido (6)	43879.00	0.424	54981.00	0.120	33602.17	0.449
Cribiforme (6)	46928.83		58806.67		30273.00	
Tubular (10)	61724.90		73871.90		42573.10	
Túbulo-papilífero (13)	47527.46		66626.54		44317.31	

DISCUSSÃO

Com o avanço da Medicina, torna-se cada vez mais importante o aparecimento de novos métodos eficazes e rápidos para a deteção de processos neoplásicos, de forma a aplicar a terapêutica adequada, o mais atempadamente possível. Desta forma, foram realizados vários estudos na mulher de forma a correlacionar a concentração de marcadores angiogénicos com a presença de doença tumoral. Um dos marcadores que tem vindo a ganhar importância no estudo de tumores mamários na mulher é o VEGF.

Embora não esteja definido que este fator aumente em caso de neoplasia na mulher, torna-se interessante estudar se estará aumentado na espécie felina. Desta forma, este estudo é pioneiro nesta área, uma vez que até à data não foi descrito nenhum outro estudo que tenha desenvolvido para esta espécie, uma técnica de quantificação do VEGF no soro.

Neste estudo participaram 44 gatas com TM, com uma idade média de 12 anos. Esta idade está de acordo com a literatura consultada que indica que a média de idade de gatas com TMs é entre 10 e 12 anos (Morris & Dobson, 2001). Chama-se a atenção para que os dados obtidos neste estudo serão avaliados segundo as conclusões obtidas por diversos autores relativos a tumores mamários na mulher, dada a ausência de dados para a espécie felina.

Vários autores não encontraram diferenças entre a média de concentrações de VEGF em pacientes e nos controlos (Duranyildiz et al, 2009, Stathopoulos et al., 2010, Hodorowicz-Zaniewska et al., 2012). No presente estudo, a média da intensidade dos píxeis no grupo das gatas doentes foi significativamente maior do que no grupo de gatas saudáveis. Este achado, assemelha-se a outros estudos realizados na mulher para quantificar o VEGF em soro ou no plasma, em que o grupo dos doentes apresenta maior concentração média de sVEGF comparativamente ao grupo controlo (Benoy et al, 2002; Co-skun et al, 2003; Thielemann et al., 2013).

Foi ainda correlacionada a intensidade de píxeis no grupo de gatas doentes com os diferentes parâmetros histológico-patológicos registados. Nestes incluiu-se: o estadio TNM, o tamanho da massa, o envolvimento do linfonodo regional, o grau de malignidade da massa, a classificação histopatológica, a positividade para os RE, a positividade para os RP, a positividade para HER-2 e o Ki-67. Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre estes parâmetros e a concentração de sVEGF. Este achado está de acordo com um estudo realizado na mulher em que a concentração de VEGF no soro sanguíneo de mulheres com tumores mamários não foi correlacionada com nenhum destes parâmetros (Hodorowicz-Zaniewska et al, 2012).

Porém, esta situação não apresenta consenso generalizado, uma vez que Rykala et al (2011) encontrou, na mulher, relação entre a concentração de VEGF no soro e o estado do linfonodo axilar, em que as mulheres que apresentavam os linfonodos metastizados apresentavam níveis mais elevados de sVEGF. Concluiu ainda que o sVEGF se apresentava aumentado

nas doentes com metástases distantes e nas mulheres com tumores positivos ao recetor de estrogénios (Rykala et al, 2011).

Noutro estudo, Duranyildiz et al. (2009) tentaram verificar se os níveis de VEGF se encontravam aumentados em mulheres com estadios iniciais de doença (I e II). Os resultados do nosso estudo estão de acordo com o artigo agora citado, uma vez que também não foram encontradas diferenças nos níveis de sVEGF, entre estadios iniciais (TNM I e II) e estadios mais avançados (TNM III e IV).

Uma vez que o tamanho tumoral é um dos parâmetros de prognóstico mais importantes na gata, foi também feita a avaliação de níveis de sVEGF em relação a tumores mais pequenos (classes 1 e 2) e tamanho maior (classe 3). Tal como noutros trabalhos relatados na mulher, não foram encontradas diferenças nos níveis de VEGF sérico entre gatas com tumores mamários mais pequenos e tumores mamários maiores.

Uma das limitações deste estudo foi o facto do anticorpo utilizado não ser específico para a espécie, apesar de já ter sido utilizado em tecidos felinos e de haver uma homologia de 94% das proteínas VEGF entre mulher e a gata. Para superar esta limitação, poderíamos ter usado um anticorpo monoclonal que fosse obtido através da imunização contra o VEGF felino. Segundo Matos et al. (2012), para otimizar e validar anticorpos monoclonais para uso em tecidos de gatos e cães devemos seguir os passos seguintes: procurar anticorpos alvo e seleccionar aqueles que apresentem alta afinidade entre espécies; usar como controlos positivos, tecidos da espécie na qual o anticorpo foi produzido e tecido canino/felino; usar um método de deteção alternativo para confirmar a especificidade do anticorpo.

De acordo com estes passos, foi garantido o primeiro, em que o anticorpo usado tem alta afinidade entre espécies. Poderíamos, ainda, ter utilizado um segundo método de deteção para avaliar o VEGF no soro de forma a validar os resultados deste estudo (p.ex. ELISA, IF).

CONCLUSÃO

Os objetivos deste estudo prendiam-se com a deteção do VEGF no soro sanguíneo de gatas com carcinomas mamários, a determinação dos níveis de VEGF, avaliação de diferenças entre a população de animais doentes e a população de animais saudáveis e a verificação de associações estatísticas entre a concentração de sVEGF e diferentes parâmetros histopatológicos.

O sVEGF foi detetado com sucesso através da técnica de *dot blot*, usando o Ac primário supracitado, tendo-se observado que as gatas com tumores mamários apresentavam níveis de sVEGF superiores aos das gatas saudáveis.

Não foram encontradas relações estatisticamente significativas entre a concentração de sVEGF e os diversos parâmetros histopatológicos analisados.

Em conclusão, a quantificação do VEGF no soro pode, no futuro, representar um biomarcador interessante para o diagnóstico de gatas com tumores mamários, embora os resultados preliminares aqui apresentados exijam uma validação através da realização de mais estudos.

Apesar do *dot blot* ser uma técnica expedita e rápida, tem muitas variáveis associadas como a experiência do operador e o estado dos reagentes usados que podem alterar o resultado. Assim, o ideal para futuros estudos será combinar outras técnicas de deteção como o ELISA ou o *Western Blot* de forma a aumentar a especificidade e a sensibilidade dos resultados.

Os resultados apresentados neste trabalho constituem um pequeno passo para desenvolver novos procedimentos de deteção de cancro mamário em felinos e poderão constituir o início do estudo de novas terapias coadjuvantes à cirurgia de forma a aumentar a esperança de vida e tempo livre de doença nestes animais.

Bibliografia

- Abcam (2016). Dot Blot Protocol. Acedido em Janeiro, 22, 2016, disponível em <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/dot%20blot%20protocol.pdf>.
- Benoy, I., Salgado, R., Colpaert, C., Weytjens, R., Vermeulen, P. B. & Dirix, L. Y. (2002). Serum Interleukin 6, Plasma VEGF, Serum VEGF, and VEGF Platelet Load in Breast Cancer Patients. *Clinical Breast Cancer*, Vol. 2, 4, 311-315.
- Caixinha, M. R. (2011). Estudo clínico e anatomopatológico de neoplasias mamárias na cadela e na gata. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B., & Caramelli, M. (1998). Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 119, 263-275.
- Castagnaro, M., Maria, R., Bozzetta, E., Ru, G., Casalone, C., Biolatti, E., Caramelli, M. (1998). Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, 65, 223-226.
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A. & Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Celular and molecular life sciences*, 63, 601-615.
- Coelho, N. F. (2013). Quantificação do domínio extracelular do oncogene her-2 no soro de gatas com carcinomas mamários – otimização e relevância clínica. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Coskun, U., Gunel, N., Sancak, B., Gunel, U., Onuk, E., Bayram, O., Yılmaz, E., Candan, S. & Ozkan, S. (2003). Significance of serum vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-I levels and nitric oxide activity in breast cancer patients. *The Breast*, 12, 104-110.
- Costa, M.M. (2010). Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de Tumores Mamários na cadela e na gata. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Dyce, K. M., Sack, W.O. & Wensing, C. J. G. (2010). Tratado de anatomia veterinária. (4ª edição). (capítulo 14). Missouri: Elsevier Saunders.
- Duranyildiz, D., Camlica, H., Soyuncu, H. O., Derin, D. & Yasasever, V. (2009). Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remains close to normal. *The Breast*, 18, 26-29.
- Esteva, F. J. & Hortobagyi, G. N. (2004). Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast cancer research*, 6, 109-118.

- Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its recetores. *Nature Medicine*, Vol. 9, 6.
- Getty, R., Grossman, J. D. & Sisson, S. (2006). Anatomia dos Animais Domésticos. (5ª edição). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Goel, H. L. & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature reviews*, 13.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144.
- Hayes, A.A. & Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, Vol. 15, 3.
- Hodorowicz-zaniewska, D., Kibil, W., Małek, A., Szpor, J., Kulig, J. & Sztefko, K. (2012). Evaluation of serum concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer patients. *Pol j pathol*, 63, 255-260.
- Hughes, K., & Dobson, J. M. (2012). Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *The Veterinary Journal*, 194, 19-26.
- Islam, M. S., Matsumoto, M., Hidaka, R., Miyoshi, N. & Yasuda N. (2012). Expression of NOS and VEGF in fleine mammary tumours and their correlation with angiogenesis. *The Veterinary Journal*, 192, 338-344.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). Histologia básica (10th ed.). (pp.449-452). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kay, I. (1998). Introduction to animal physiology. Department of biological sciences. Manchester. UK.: Bios scientific Publishers Ltd.
- Kliche, S. & Waltenberger, J. (2001). VEGF Receptor Signaling and Endothelial Function. *Life*, 52, 61-66.
- Koga, L., Kobayashi, Y., Yazawa, M., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2002). Nucleotide sequence and expression of the feline vascular endothelial growth factor. *Journal of veterinary medicine science*, 64 (5), 453-456.
- König, H. E. & Liebich, H. (2004). Veterinary anatomy of domestic mammals (4th ed.), Schattauer.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R. & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), Small animal clinical oncology (4th ed.). (pp. 619-634). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Maae, E., Nielsen, M., Steffensen, K. D., Jakobsen, E. H., Jakobsen A. & Sorensen, F. B. (2011) Estimation of Immunohistochemical Expression of VEGF in ductal carcinomas of the breast. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59 (8), 750-760.

- Marty, M. & Pivot, X. (2008). The potential of anti-vascular endothelial growth factor therapy in metastatic breast cancer: Clinical experience with anti-angiogenic agents, focusing on bevacizumab. *European Journal of cancer*, 444, 912-920.
- Matos, A. J. F., Baptista, C. S., Gärtner, M. F. & Rutteman, G. R. (2012). Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. *The Veterinary Journal*, 193, 24-31.
- Mercurio, A.M, Lipscomb, E. A. & Bachelder, R. E. (2005). Non-Angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *Journal mammary gland biol neoplasia*, 10, 283-290.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 79, 225-232.
- Millanta, F., Calandrella, M., Citi, S., Della Santa, D., Poli, A., (2005). Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: An immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. *Veterinary Pathology* 42, 30–34.
- Millanta, F., Lazzeri, G., Vannozzi, I., Viacava, P & Poli, A. (2002). Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression to Overall Survival in Feline Invasive Mammary Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 39, 690-696.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals (2nd ed., Vol. VII). Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology.
- Misdorp, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), Tumors in domestic animals (4rd ed.). (pp. 575-606). Iowa: Iowa State Press, Blackwell Publishing Company.
- Morris, J. (2001). Mammary gland. In J., Morris & J. Dobson (Eds.), Small animal oncology. (pp.184-190). Oxford: Blackwell Science.
- Mylona, E., Alexandrou, P., Giannopoulou, I., Liapis, G., Sofia, M., Keramopoulos, A. & Nakopoulou, L. (2007). The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 104, 557-563.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its recetores. Vol. 13. *The FASEB Journal*, 13, 9-22.
- Obermair, A., Kucera, E., Mayerhofer, K., Speiser, P. Seifert, M., Czerwenka, K., Kaider, A., Leodolter, S., Kainz, C. & Zeillinger, R. (1997) Vascular endotelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 74, 455-458.
- Pande, D., Negi, R., Khanna, S. & Khanna, H. D. (2011) Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Relation to Oxidative Damage and Antioxidant Status in Patients with Breast Cancer. *Journal of breast cancer*.

- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.
- Perez-Rivas, L. G., Jerez, J. M., Fernandez-De Sousa, C. E., De Luque, V., Quero, C., Pajares, B., Franco, L., Sanchez-munoz, A., Ribelles N. & Alba, E. (2012). Serum protein levels folBaixoiing surgery in breast cancer patients: A protein microarray approach. *International Journal of Oncology* 41, 2200-2206.
- Rahman, M. A. & Toi, M. (2003). Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 57, 463-470.
- Rykala, J., PrzybyBaixoska, K., Majsterek, I., Pasz-Walczak, G., Sygut, A., Dziki, A. & Kruk-Jeromin, J. (2011). Angiogenesis Markers Quantification in Breast Cancer and Their Correlation with Clinicopathological Prognostic Variables, *Pathol. Oncol. Res.*, 17, 809-817.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., Bento, M. J., & Lopes, C. (2011). Grade is na independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, 187, 65-71.
- Shafiee, R., Javanbakht, J., Atyabi, N., Bahrami, A., Kheradmand, D., Safaei, R., Khadivar, F. & Hosseini, E. (2013). Comparative value of clinical, cytological, and histopathological features in feline mammary gland tumors; an experimental model for the study of human breast cancer. *Diagnostic Pathology*, 8.
- Skorupski, K. A., Overley, B., Shofer, F. S., Golschmidt, M. H., Miller, C. A & Sørenmo, K. U. (2005). Clinical Characteristics of Mammary Carcinoma in Male Cats. *Journal of Veterinary Internal Medecine*, 19, 52-55.
- Soares, M., Correia, J., Carvalho, S. & Ferreira, F. (2012). Evaluation of fHER2 expression in feline mammary tumors and its correlation with clinicopathological features. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 107, 191-198.
- Soares, M., Ribeiro, R., Carvalho, S., Peleteiro, M., Correia, J. & Ferreira, F. (2015). Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value?. *Veterinary Pathology*, 1, 7.
- Sorenmo, K.U., Worley, D.R. & Goldschmidt, M.H. (2013). Tumors of the mammary gland. In Withrow, S. J., Vail, D.M. & Page, R.L. *Small animal clinical oncology*. (5th ed.). (pp.538-547). Missouri: Elsevier Saunders.
- Stathopoulos, J., Armakolas, A., Stathopoulos, G. P. & Gomatos, I. P. (2010). Plasma VEGF levels in breast cancer patients with and without metástases. *Oncology Letters*, 1, 739-741.
- Toi, M., Hoshina, S., Takayanagi, T. & Tominaga, T. (1994) Association of vascular endotelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. Tokyo: *Jpn J. Cancer Res.*, 85, 1045-1049.
- Thielemann, A., Baszczuk, A., Kopczyński, Z., Kopczyński, P. & Grodecka-Gazdecka, S. (2013). Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol. 20, 2, 293-297.

Uniprot (2015) Caracterização da VEGF-A felina. Acedido a Março, 15, 2015, disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q95LQ4>

Zappuli, V., Rasotto, R., Caliare, D., Mainenti, M., Peña L., Goldschmidt, M. H. & Kiupel, M. (2014). Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A review of the literature. *Veterinary Pathology*, 52, 46-50.

Zhang, J., Yin, L., Wu, J., Zhang, Y., Xu, T., Ma, R., Cao, H. & Tang, J. (2014) Detection of serum VEGF and MMP- 9 levels by Luminex multiplexed assays in patients with breast infiltrative ductal carcinoma. *Experimental And Therapeutic Medicine*, 8, 175-180.

Zhang, S. J., Hu, Y., Qian, H. L., Jiao, S. C., Liu, Z. F., Tao, H. T. & Han, L. (2013). Expression and Significance of ER, PR, VEGF, CA15-3, CA125 and CEA in Judging the Prognosis of Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 3937-3940.

ANEXOS

Anexo 1: Caracterização detalhada dos tumores

Tabela 10. Descrição dos tumores mamários das gatas doentes.

Caso	Linfonodo	TNM	T (cm)	T classe	Malignidade	Ki67	RP	RE	HER-2
1	Negativo	3	4	3	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
5	Negativo	3	4	3	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
9	Negativo	1	0,6	1	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
10	Negativo	3	4	3	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
11	Negativo	1	0,3	1	II	Alto	Positivo	Positivo	Negativo
12		2	3	2	III	Alto	Negativo	Negativo	Positivo
15	Negativo	2	2	2	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
19	Positivo	3	3	2	III	Baixo	Negativo	Positivo	Positivo
20	Positivo	3	1,5	1	III	Baixo	Positivo	Negativo	Positivo
22		3	5	3	II	Baixo	Negativo	Positivo	Positivo
23	Positivo	3	4	3	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
27	Positivo	3	2	2	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
29	Negativo	1	1,5	1	III	Alto	Negativo	Negativo	Positivo
30	Positivo	3	0,4	1	II	Alto	Positivo	Positivo	Negativo
38	Positivo	3	2,5	2	III	Alto	Negativo	Positivo	Negativo
39	Negativo	2	3	2	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
42	Negativo	2	2	2	III	Alto	Positivo	Positivo	Negativo
43	Negativo	2	2	2	I	Baixo	Negativo	Positivo	Negativo
45	Negativo	3	6	3	II	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
50	Negativo	1	1,5	1	II	Baixo	Positivo	Negativo	Positivo
54	Negativo	4	0,5	1	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
55	Positivo	3	5	3	III	Alto	Negativo	Positivo	Positivo
59	Positivo	3	2	2	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
62	Positivo	3	4	3	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
63	Negativo	3	3	2	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
65	Negativo	1	1	1	II	Baixo	Negativo	Positivo	Negativo
67	Negativo	4	2,5	2	III	Baixo	Positivo	Negativo	Negativo
69	Negativo	1	1,5	1	I	Baixo	Negativo	Positivo	Positivo

Tabela 10. (Continuação)

70	Positivo	3	6	3	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
71	Positivo	3	4	3	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
77	Positivo	4	2,5	2	III	Baixo	Negativo	Negativo	Negativo
80	Negativo	1	2,5	2	III	Baixo	Negativo	Negativo	Negativo
81	Negativo	2	3	2	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
82	Positivo	3	3,5	3	III	Alto	Positivo	Negativo	Negativo
83	Positivo	3	3	2	III	Alto	Positivo	Positivo	Positivo
84	Negativo	3	5	3	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
87	Negativo	2	2	2	III	Baixo	Negativo	Positivo	Negativo
88		1	0,9	1	II	Alto	Negativo	Positivo	Negativo
90	Negativo	1	1,5	1	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
91	Positivo	3	2,5	2	III	Alto	Negativo	Negativo	Negativo
94	Negativo	1	0,5	1	III		Negativo	Positivo	Negativo
96	Negativo	3	4	3	II	Alto	Negativo	Positivo	Negativo
97	Negativo	1	1	1	II	Alto	Negativo	Positivo	Negativo
104		1	1,5	1		Alto	Negativo	Negativo	Negativo

Anexo 2: Resultados obtidos

Tabela 11. Valores obtidos na quantificação da intensidade de píxeis nas gatas saudáveis, por membrana.

Caso	Densidade M1	Densidade M2	Densidade M3
N2	26389	41575	39450
N4	51639	60566	39380
N10	37620	64475	37347
N11	19712	44572	30517
N15	22249	43730	20431
N16	16858	29152	17381
N19	60519	60552	33672
N20	23070	47917	26391
N21	29074	58173	36950
N27	47726	81416	36593
N30	16498	18307	12040
N32	42643	58694	37211
N34	65985	64366	25737
N37	31504	37827	27143

Tabela 12. Valores obtidos na quantificação da intensidade dos píxeis em gatas com TM, por membrana.

Caso	Densidade M1	Densidade M2	Densidade M3
1	43561	65720	43912
5	54919	95087	66129
9	31542	41122	53488
10	71058	78025	49106
11	92419	99760	85771
12	29256	43520	20456
15	43666	63730	32605
19	32123	49610	35175
20	120456	96220	59368
22	45609	70024	44016
23	38523	73275	52716
27	31420	42286	35081
29	22495	32274	60813
30	33268	41988	25108
38	71631	73182	35634
39	32951	57546	45243
42	72122	78885	60499
43	22380	56091	35058
45	81639	95739	65398
50	49110	51047	23452
54	73145	72678	37812
55	27687	39472	24107
59	12206	11643	15846
62	36044	88144	49878
63	72345	93543	42382
65	67489	96610	55471
67	28891	53069	30630
69	59545	60680	35631
70	29666	48933	28325
71	34559	51305	28689
77	65685	68921	39445
80	34962	54402	41061
81	63913	97941	44065
82	42794	67427	36527
83	16853	24680	21482
84	92176	92140	39537
87	69828	71147	30395
88	46531	40839	18895
90	46061	69652	39509
91	119606	114292	56508
94	60873	63014	37387
96	38147	66226	25371
97	26497	55569	23570
104	22637	54689	36732

Anexo 3: Resultados dos testes t

Tabela 13. Resultados dos testes t relativos a cada membrana, incluindo média, desvio padrão e valor de *P*.

Parâmetro (N)	M1	<i>P</i>	M2	<i>P</i>	M3	<i>P</i>
Metástases regionais						
N1 (15)	47501.40 ± 33197.86	0.449	59425.20 ± 27363.85	0.141	36259.27 ± 13204.04	0.101
N0 (25)	54069.36 ± 21284.19		70467.88 ± 19113.65		44171.80 ± 15082.39	
Ki67						
Alto (11)	54188.91 ± 27534.39	0.533	66165.55 ± 16797.54	0.859	39063.82 ± 10691.46	0.764
Baixo (32)	48479.28 ± 25433.73		64728.50 ± 24625.18		40662.31 ± 16289.66	
RP						
- (25)	49980.72 ± 24753.81	0.952	65581.88 ± 20700.13	0.859	38158.56 ± 12458.87	0.302
+ (19)	50461.58 ± 27192.41		64347.37 ± 25100.63		42858.89 ± 17375.11	
RE						
- (28)	50903.07 ± 27654.44	0.809	66941.79 ± 23715.48	0.466	41954.04 ± 13038.91	0.300
+ (16)	48937.63 ± 22106.02		61736.06 ± 20297.33		37098.13 ± 17449.98	
HER-2						
- (35)	51575.83 ± 24104.32	0.484	68417.71 ± 21674.38	0.048	41250.94 ± 14579.05	0.353
+ (9)	44792.67 ± 31492.46		51947.44 ± 21582.89		36055.56 ± 15724.49	
TNM						
I (12)	46680.08 ± 20965.63	0.911	59971.50 ± 20616.49	0.842	42648.33 ± 18811.13	0.884
II (7)	47730.86 ± 20672.15		66980.00 ± 17730.30		38331.57 ± 12897.48	
III (22)	52104.09 ± 30180.11		67225.50 ± 26207.12		40013.41 ± 14330.23	
IV (3)	55907.00 ± 23692.01		64889.33 ± 10407.64		35962.33 ± 4689.56	
Tamanho						
T1 (14)	53719.14 ± 28185.00	0.826	62581.57 ± 22097.44	0.459	42357.64 ± 18603.85	0.444
T2 (17)	48225.76 ± 27915.51		62028.71 ± 25703.09		36562.65 ± 11664.54	
T3 (13)	48952.46 ± 20335.99		71655.15 ± 18062.88		42593.15 ± 14015.18	
Malignidade						
I (2)	40962.50 ± 26279.62	0.828	58385.50 ± 3244.91	0.826	35344.50 ± 405.17	0.895
II (9)	53412.11 ± 22378.65		68644.67 ± 23602.07		40783.56 ± 23491.96	
III (32)	50719.28 ± 26814.36		64777.66 ± 23320.53		40431.56 ± 12596.56	
Conjunto TNM						
I e II (19)	47064.21 ± 20281.41	0.486	62553.58 ± 19406.15	0.526	41057.95 ± 16621.44	0.738
III e IV (25)	52560.44 ± 29074.92		66945.16 ± 24710.07		39527.28 ± 13539.72	
Conjunto tamanho						
T1 e T2 (31)	50706.65 ± 27705.24	0.838	62278.39 ± 23749.09	0.210	39179.74 ± 15203.23	0.491
T3 (13)	48952.46 ± 20335.99		71655.15 ± 18062.88		42593.15 ± 14015.18	
Classificação histopatológica						
Espinocelular (1)	22637.00 ± -	0.424	54689.00 ± -	0.120	36732.00 ± -	0.449
Papilar (3)	32964.33 ± 23191.74		39211.33 ± 18976.17		39308.67 ± 19921.74	
Mucinoso (5)	61361.00 ± 16386.83		80446.80 ± 15215.80		45703.60 ± 11549.18	
Sólido (6)	43879.00 ± 18631.30		54981.00 ± 12468.87		33602.17 ± 7450.39	
Cribiforme (6)	46928.83 ± 23267.13		58806.67 ± 18342.66		30273.00 ± 6394.39	
Tubular (10)	61724.90 ± 27669.28		73871.90 ± 18484.16		42573.10 ± 15806.44	
Túbulo-papilífero (13)	47527.46 ± 29632.32		66626.54 ± 28154.18		44317.31 ± 18360.06	